



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO
ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

ROSA ANITA RODRIGUES FERNANDES

***FISIOPATOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E
LABORATORIAL DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA BCR-
ABL POSITIVA***

ARTIGO REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO RIBEIRO

JANEIRO 2012

Fisiopatologia, caracterização clínica e laboratorial da Leucemia Mielóide Crónica BCR-ABL positiva

“Though this be madness, yet there is method in it.”

Shakespeare W., *Hamlet*. Acto 2, Cena 2.

Índice

RESUMO:	v
LISTA DE ABREVIATURAS:	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. EPIDEMIOLOGIA	6
3. CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELÓIDES	7
3.1. Origem e classificação das neoplasias mielóides.....	7
3.2. As neoplasias mieloproliferativas	12
4. ETIOLOGIA DA LMC	15
5. BASES GENÉTICAS E MOLECULARES	16
5.1. Anatomia molecular da translocação BCR-ABL.....	18
5.2. Mecanismos de transformação maligna.....	27
5.3. Progressão para crise blástica	30
6. DIAGNÓSTICO	32
6.1. Caracterização clínica	32
6.2. Caracterização laboratorial	34
6.3. Caracterização citogenética	37
7. EVOLUÇÃO DA DOENÇA	39
7.1. História natural	39
7.2 . Prognóstico	43
8. TRATAMENTO	47
8.1. Definição de resposta ao tratamento	47

8.2. Quimioterapia	49
8.3. Interferão α	50
8.4. Transplante de medula óssea	51
8.5. Novos fármacos dirigidos a alvos moleculares – Os inibidores de tirosina cinases	54
9. CONCLUSÃO	59
10. BIBLIOGRAFIA	61

RESUMO:

As doenças mieloproliferativas (DMP) ou neoplasias mieloproliferativas (NMP) englobam um grupo de patologias da célula estaminal hematopoiética multipotente caracterizadas pela proliferação clonal de uma ou várias linhagens celulares na medula óssea (MO).

Com os recentes avanços na área da biologia molecular, a classificação actual da Organização Mundial de Saúde (OMS) engloba, além das NMP crónicas clássicas (policitémia vera, trombocitémia essencial e mielofibrose), doenças como a Leucemia Mielóide Crónica BCR-ABL positiva (LMC), a Leucemia Neutrófila Crónica, a Leucemia Eosinófila Crónica, a Doença Sistémica dos Mastócitos e as NMP crónicas não classificáveis noutras doenças.

A LMC é a NMP mais frequente (15% todas as leucemias dos adultos), representando 3% de todas as neoplasias malignas humanas. A sua incidência é de 6 a 10 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo ligeiramente mais elevada no sexo masculino que no feminino. A idade do diagnóstico é habitualmente entre os 40 e 60 anos, embora possa ocorrer na infância (LMC juvenil).

A LMC foi a primeira doença maligna em que se identificou uma anomalia cromossómica, o cromossoma Philadelphia (Ph). Este é o produto de uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, a $t(9;22)(q34;q11.2)$, que conduz à fusão sequencial do gene da região do grupo de quebra (*BCR*) no cromossoma 22q11.2 com o gene *ABL* localizado no cromossoma 9q34. O gene quimérico *BCR-ABL* resultante codifica uma proteína de fusão, BCR/ABL, com actividade de tirosina cinase constantemente activa. Apesar desta alteração ser predominante na linhagem neutrófila, pode ser encontrada em todas as células da linhagem mielóide, assim como nalgumas células linfóides e endoteliais.

O início da patologia é geralmente insidioso, apresentando sintomas de carácter inespecífico como astenia, anorexia, perda de peso, sudorese nocturna e dor ou massa abdominal (hepato e esplenomegália).

O diagnóstico é muitas vezes feito através de um hemograma de rotina onde é observado leucocitose, à custa do aumento do número de granulócitos imaturos e maduros, trombocitose e anemia normocítica normocrómica ligeira. Na medula observa-se hiperplasticidade com maturação hematopoiética. Posteriormente pode evoluir para falência medular com mielofibrose, hematopoiese ineficaz ou transformação para uma fase aguda blástica e posterior evolução para leucemia aguda.

O objectivo da terapêutica da LMC é a erradicação de toda a população celular que contenha o transcrito *BCR-ABL* (remissão molecular completa) e por fim a cura. Neste sentido, existem diversas medidas terapêuticas, sendo de salientar como tratamento de primeira linha o Imatinib, um inibidor de tirosina cinases.

A realização deste trabalho procura fazer uma revisão sobre o actual conhecimento da fisiopatologia, semiologia, diagnóstico clínico-laboratorial e terapêutica da LMC.

Palavras-Chave: Leucemia mielóide crónica, Doenças mieloproliferativas, Cromossoma Philadelphia, Gene quimérico BCR-ABL, tirosina cinase.

ABSTRACT:

Myeloproliferative disorders (MPD) include a group of pathologies of pluripotential hematopoietic stem cell characterized by clonal proliferation of one or more cell lineages in the bone marrow (BM).

With recent advances in molecular biology, the current classification of the World Health Organization (WHO) includes, in addition to classic chronic MPDs' (polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis), diseases such as chronic myeloid leukemia BCR-ABL positive (CML), the Chronic Neutrophilic Leukemia, Chronic Eosinophilic Leukemia, Mastocytosis NMP not classifiable in other chronic diseases.

The CML is the most frequent MPD (15% of all adult leukemias), representing 3% of all human cancer malignancies. Its incidence is 6 to 10 cases per 100,000 inhabitants per year, being slightly higher in males than in females. The age of diagnosis is usually between 40 and 60 years of age, although it may also occur in childhood (juvenile CML).

CML was the first malignancy disease in which it was identified a chromosomal abnormality, the Philadelphia chromosome (Ph). This is the product of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, the t(9; 22) (q34; q11.2), which results in a fusion sequence of the breakpoint cluster region (BCR) gene on chromosome 22q11.2 with the ABL gene located on chromosome 9q34. The resulting chimeric gene *BCR-ABL* encodes a fusion protein, BCR-ABL, with tyrosine kinase activity which is constantly active. Despite this alteration being predominant in the neutrophilic lineage, it may be found in all cells of the myeloid lineage, as well as some lymphoid cells and endothelial cells.

The onset of the disease is usually insidious, presenting nonspecific symptoms such as asthenia, anorexia, weight loss, night sweats, and pain or abdominal mass (splenomegaly and hepatomegaly).

The diagnosis is often done through a routine blood test where leukocytosis is observed at the expense of increasing the number of mature and immature granulocytes, thrombocytosis and mild normochromic normocytic anemia. In bone marrow hypercellularity is observed with hematopoietic maturation. However, Bone Marrow may often later progress into failure with myelofibrosis, ineffective hematopoiesis or transform into an acute blast phase.

The object of therapy of CML is the eradication of the entire population of cells containing the *BCR-ABL* transcript (complete molecular remission) and the eventual cure. In this line of therapy, there are several other therapeutic measures, emphasizing imatinib, a tyrosine kinase inhibitor as a first line treatment.

The realization of this thesis seeks to review the overall current knowledge on the pathophysiology, clinical and laboratorial diagnosis and therapy of CML.

Key-words: Chronic Myeloid Leukemia; Myeloproliferative disorders; Philadelphia chromosome; chimeric gene BCR-ABL; tyrosine kinase.

LISTA DE ABREVIATURAS:

ABL – *Abelson Leukemia*

ATF - *Activating Transcription Factor*

BCR – *Breakpoint Cluster Region*

CB – Crise Blástica

CEH – Célula Estaminal Hematopoiética

CEL – Célula Estaminal Leucémica

DMP – Doenças mieloproliferativas

DSM – Doença Sistémica dos Mastócitos

ELK1 - *ETS-like transcripition factor 1*

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FA – Fase Acelerada

FC – Fase Crónica

GCK(R) - *Germinal Center Kinase Related*

LEC – Leucemia Eosinofílica Crónica

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

LNC – Leucemia Neutrofílica Crónica

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*MFP – Mielofibrose Primária

MO – Medula Óssea

NMP – Neoplasias Mieloproliferativas

OMS – Organização Mundial de Saúde

PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinases*

Ph - Filadélfia

PV – Policitemia Vera

RCyC – Resposta citogenética completa

RHC – Resposta hematológica completa

RHP – Resposta hematológica parcial

RMC – Resposta molecular completa

SAPK - *Stress Activated Protein Kinase*

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SMD/NMP - Síndromes Mielodisplásicas/Neoplasias Mieloproliferativas

Sp – Sangue periférico TCE – Transplante de células estaminais

TE – Trombocitemia Essencial

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMP) são um grupo heterogêneo de Neoplasias Mielóides caracterizadas pelo aumento da proliferação de uma ou mais linhagens mielóides, granulocítica, eritróide, megacariocítica ou mastocítica no sangue periférico (Skoda R, 2010) na ausência de um estímulo aparente. São doenças clonais da célula estaminal hematopoiética (Steensma e Tefferi, 2003; Kaushansky K, 2005; Schafer A, 2006; Levine e Gilliland, 2008; Vardiman JW *et al.*, 2008) que resultam de mutações somáticas adquiridas (Tefferi e Gililand, 2007), geralmente em genes que codificam proteínas com actividade de tirosina cinase (TK) (Figura 1) (Vardiman JW *et al.*, 2008).

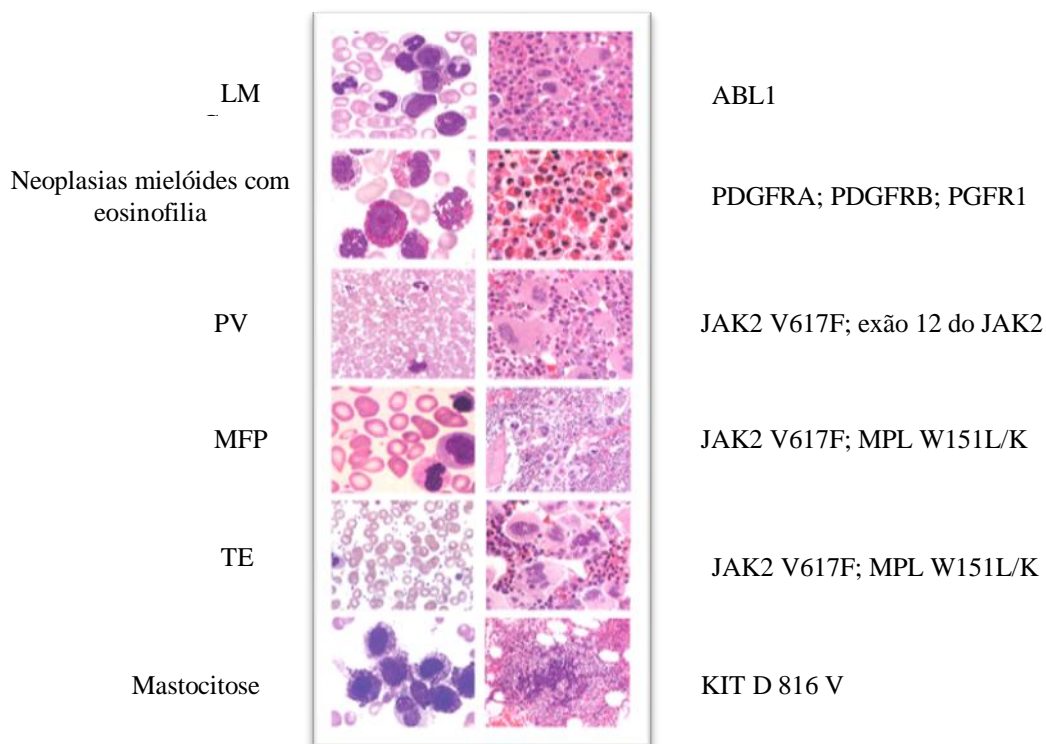


Figura 1. Neoplasias mieloproliferativas (NMP) e outras neoplasias mielóides associadas a mutação/rearranjo dos genes tirosina cinase. (Adaptado de Vardiman J W *et al.*, 2008)

Este grupo de patologias partilha entre si algumas características como a hiperplasticidade da medula óssea (MO) e uma hematopoiese exuberante com maturação hematopoiética (Vardiman JW *et al.*, 2008), aumento de uma ou mais linhagens mielóides, granulocítica, eritróide, megacariocítica ou mastocítica no sangue periférico (Tefferi A, 2003; Delhommeau F *et al.* 2006; Haferlach T *et al.*, 2008; Helmann A, 2008; Vardiman JW *et al.*, 2008) que muitas vezes se pode estender a localizações extra-medulares (Kaushansky K, 2005) com hepato e esplenomegália e propensão para hemorragias e trombose (Spivak e Silver, 2008). O diagnóstico diferencial é feito através de critérios clínicos, histológicos e, cada vez mais, por critérios moleculares. A nova classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) engloba neste grupo a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE), a Mielofibrose (MF), a Leucemia neutrofílica crónica (LNC), a Leucemia eosinofílica crónica (LEC), a Doença sistémica dos mastócitos (DSM), as Neoplasias mieloproliferativas crónicas não classificáveis noutras doenças (NMP-NC) e a Leucemia Mielóide Crónica BCR-ABL positiva (LMC) (Tabela 1) (Swerdlow S *et al.*, 2008).

Tabela 1. Neoplasias Mieloproliferativas

Leucemia Mielóide Crónica, BCR-ABL1 positiva (LMC)
Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC)
Policitemia Vera (PV)
Mielofibrose Primária (MFP)
Trombocitemia Essencial (TE)
Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC)
Doença Sistémica dos Mastócitos (DSM)
Neoplasias Mieloproliferativas, não classificáveis noutro grupo (NMP-NC)

(Adaptado de Swerdlow S *et al.*, 2008)

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma doença clonal mieloproliferativa, que se caracteriza pelo crescimento descontrolado das células hematopoiéticas da linhagem mielóide, em particular granulocítica. É provavelmente a neoplasia humana mais estudada (Deininger M *et al.*, 2000), sendo a primeira doença em que foi identificada uma alteração genética relacionada com a doença. Esta alteração ocorre na célula estaminal hematopoiética multipotente e resulta de uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, dando origem a um cromossoma quimérico designado por cromossoma Philadelphia (Ph) (Figura 2). Desta translocação resulta uma fusão sequencial do gene da região do grupo de quebra (*BCR*) no cromossoma 22q11 com o gene *ABL* localizado no cromossoma 9q34, o gene *BCR/ABL* (Longo D *et al.*, 2008). Este gene codifica uma proteína de fusão com função de tirosina cinase desregulada, a proteína BCR/ABL, envolvida na activação da proliferação, inibição da apoptose e alteração da adesão celular (Figura 3). Esta célula-estaminal alterada prolifera e gera uma população de células em vários estádios de diferenciação que gradualmente substitui a hematopoiese normal e leva à formação de uma massa mielóide de volume significativo (Hoffbrand AV *et al.*, 2008).

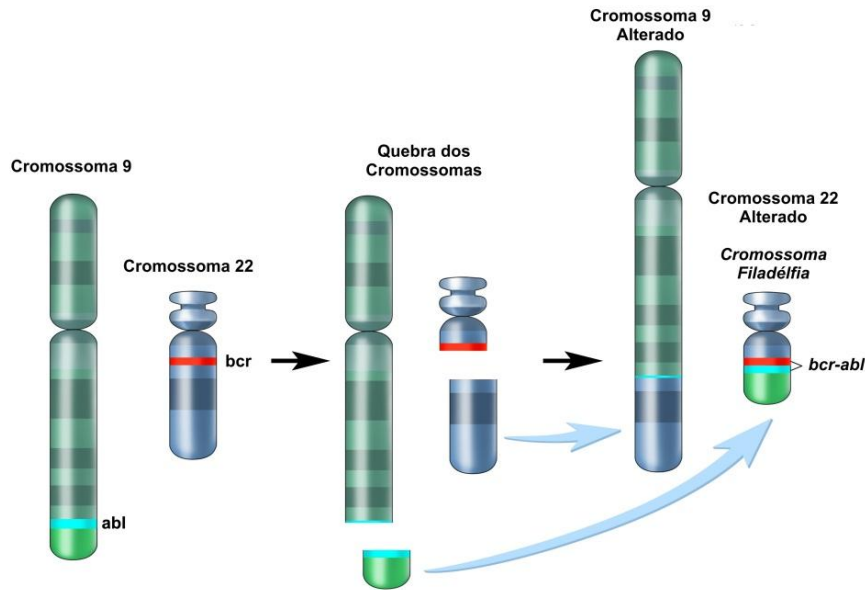
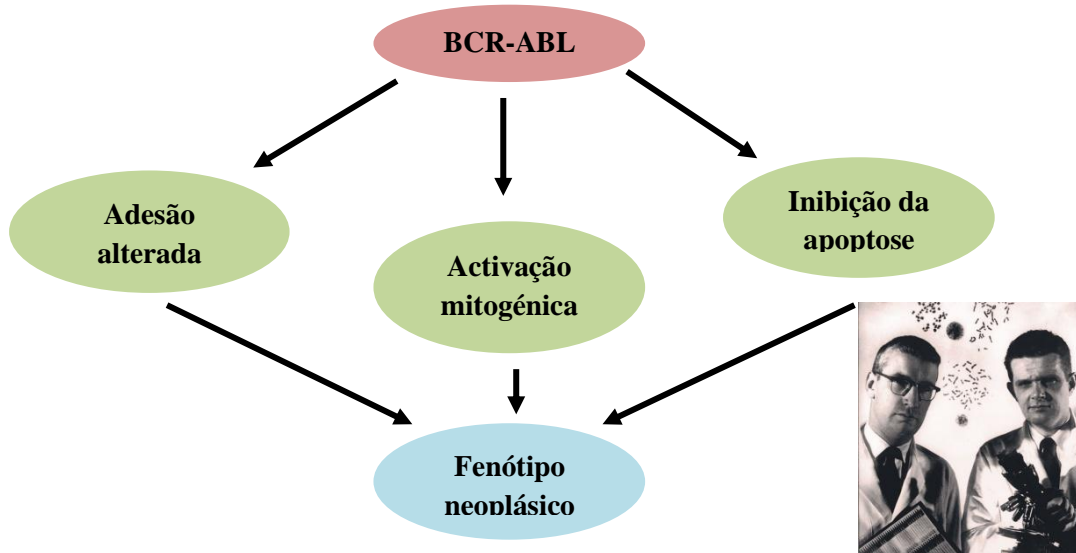


Figura 2 - Formação do Cromossoma Filadélfia (Ph). Da translocação recíproca entre o cromossoma 9 e o 22, resulta a justaposição entre o gene *BCR* e o gene *ABL*. Após a translocação, o cromossoma 22 apresenta dimensões reduzidas (adaptado de *Cancer National Institute*, 2010).

Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1845 por dois patologistas, os Drs. Rudolf Virchow e John H. Bennett. Em 1960, Peter Nowel e David Hungerford, que trabalhavam em Filadélfia, descreveram uma anomalia cromossômica constante em doentes com LMC, um cromossoma acrocêntrico que se pensou ser devido a uma deleção. Como mencionado, este foi o primeiro exemplo de uma relação causal entre uma anomalia cromossômica específica e uma neoplasia, no entanto esta descoberta foi encarada com ceticismo. Só em 1973 a Dra. Janet Rowley determinou que o cromossoma Ph era produto de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. No entanto o potencial leucemogénico do gene *BCR-ABL* só foi confirmado em 1990, quando os investigadores dos laboratórios de John Groffen e George Delay induziram uma síndrome semelhante a leucemia em modelos animais, por introdução do gene *BCR-ABL*, como evento oncogénico único (Druker B, 2008).



Nowell e Hungerford

Figura 3. Mecanismos implicados na patogénese da LMC. (Adaptado de Deininger M *et al.*, 2007).

Na ausência de tratamento, a história natural da doença é bi ou trifásica, progredindo de uma fase crónica (FC) inicial, para uma fase acelerada (FA), terminando numa crise blástica (CB) marcada por um bloqueio na diferenciação celular, acumulação de blastos e diminuição da hematopoiese normal (Bhatia e Radich, 2009). A fase crónica inicial é indolente, e caracterizada por hiperplasia medular e aumento do número de células mielóides circulantes em vários estádios de diferenciação, é seguida pelas fases avançadas (fase acelerada e/ou crise blástica) (Longo D *et al.*, 2008; Swerdlow S *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009). Este processo estabelece-se num tempo médio de 4 a 6 anos (Druker B, 2008; Longo D *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a LMC tem sido diagnosticada em cerca de 20 a 40% dos casos numa fase crónica, antes do desenvolvimento de sintomatologia, como resultado de um “hemograma de rotina” realizado durante um exame médico em pessoas aparentemente saudáveis. No entanto, quando presentes, os sintomas poderão incluir astenia, perda ponderal, hematomas espontâneos e gengivorragias, entre outros.

De salientar que a LMC foi uma das primeiras patologias neoplásicas em que se confirmou que a terapêutica com agentes biológicos (interferão) suprimia o clone leucémico e prolongava a sobrevivência (Faderl S *et al.*, 1999). No entanto, a maior revolução no tratamento da LMC ocorreu com a introdução, em 1998, dos inibidores da tirosina cinase, os quais permitiram que a maioria dos doentes atinja uma resposta citogenética completa e beneficiem de aumento da sobrevivência (Hoffbrand V. *et al.*, 2008). Até à data o único tratamento que provou ser curativo foi o transplante alogénico de células estaminais (TCE) progenitores hematopoiéticas, mas está associado a mortalidade e morbidade significativas (Druker B, 2008).

2. EPIDEMIOLOGIA

Obter informação fidedigna acerca da epidemiologia da LMC é uma tarefa difícil, uma vez que os dados variam de forma significativa entre as diferentes fontes consultadas. Segundo Faderl, S. *et al.*, (1999) a incidência da doença em adultos é de 15%, já Radich (2011) refere uma incidência de 20%. Essas diferenças poderão ser indicativas de variações étnicas ou geográficas e não resultarem de artefactos técnicos (Rohrbacher M *et al.*, 2009). No entanto, os valores de incidência publicados poderão ser superiores aos verdadeiros, uma vez que nesses estudos os casos de LMC *BCR-ABL* negativos também estão contabilizados (Rohrbacher M *et al.*, 2009).

Segundo um estudo de vigilância epidemiológica Francês, a prevalência da doença tem aumentado nos últimos anos. Este facto pode estar relacionado com a utilização de Imatinib, o qual induz um aumento da sobrevivência e esperança média de vida dos doentes tratados (Rohrbacher M *et al.*, 2009).

No que diz respeito à idade média de diagnóstico, os valores entre os registos e os ensaios clínicos podem diferir 10 a 20 anos entre si, encontrando-se entre os 48/49 anos em registos de centros de investigação e entre 64 a 68 anos nos registos populacionais (Rohrbacher M *et al.*, 2009). No entanto, esta é uma patologia rara na infância, representando apenas 2 a 3% das leucemias em menores de 15 anos. Neste grupo etário mais de 80% dos diagnósticos ocorrem após os 4 anos de idade, existindo, no entanto, relatos da ocorrência da doença em lactentes menores de 24 meses de idade (Lee M, 2008).

A variação entre géneros também é significativa, uma vez que a frequência da doença é superior no sexo masculino: a relação masculino/feminino varia entre 1,3 e 1,8 (Rohrbacher M *et al.*, 2009).

3. CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELÓIDES

3.1. Origem e classificação das neoplasias mielóides

Todo o processo de formação das células hematopoiéticas se inicia com a divisão da CEH, que origina uma nova CEH por auto-renovação e uma célula progenitora multipotente (CPM). Esta CPM origina os precursores das diferentes linhagens: a célula linfóide progenitora (CLP), para a linhagem linfóide, e a célula mielóide progenitora (CMP), para a mielóide. De acordo com os estímulos presentes, estas células, já comprometidas com uma das linhagens, vão sofrer maturação originando os vários elementos sanguíneos. As CLP vão formar os linfócitos B, os

linfócitos T e as células *natural killer* (NK). Por sua vez, as CMP vão formar os granulócitos, os macrófagos, as plaquetas e os eritrócitos (Dalerba P *et al.*, 2007; Lobo NA *et al.*, 2007) (Figura 4). No entanto, neste processo, o microambiente da medula óssea é essencial para a manutenção das células estaminais, bem como para o crescimento e diferenciação dos vários elementos sanguíneos. Assim, as condições são mantidas devido à presença de adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos que asseguram a secreção de factores de crescimento; e de uma rede de microvasos, que permite que as células maduras alcancem a circulação sanguínea (Fox SI, 1996; Hoffbrand AV *et al.*, 2006; Myatt SS *et al.*, 2007; Alves R, 2011).

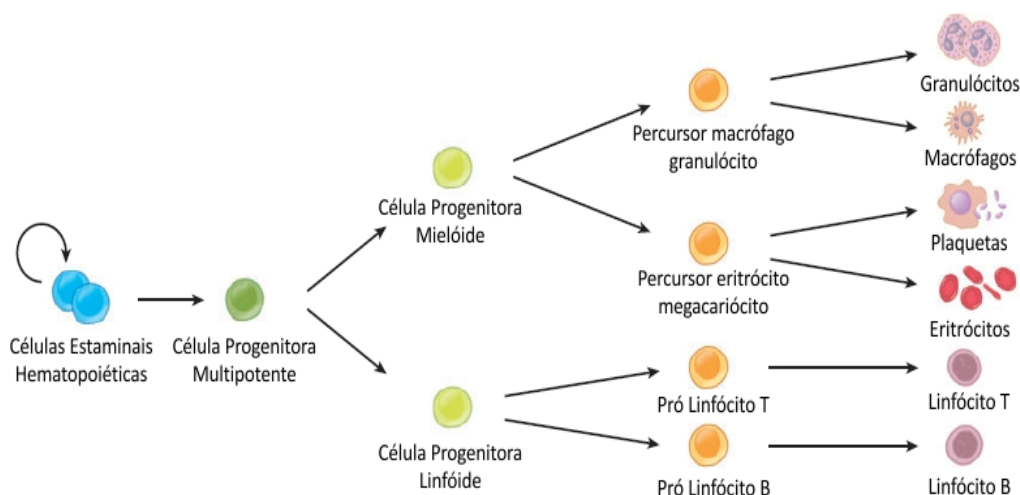


Figura 4 – Esquema representativo da hematopoiese. As células progenitoras hemopoiéticas (CEH) autorenovam-se e originam as células progenitoras multipotentes (CPM), que por sua vez se diferenciam em células precursoras da linhagem mielóide e linfóide (CMP e CLP). Estas vão originar os precursores dos diferentes elementos sanguíneos, que culminam em células maduras (Adaptado de Lobo NA *et al.*, 2007; Alves R, 2011).

Dado o curto tempo de semi-vida dos componentes celulares sanguíneos e a constante reposição e maturação ao nível da medula óssea, a hematopoiese torna-se um processo passível de acumulação de erros, e conseqüente desenvolvimento de neoplasias.

As leucemias constituem um grupo de neoplasias hematológicas, que resultam da desregulação da proliferação, diminuição da apoptose e/ou bloqueio da diferenciação das células hematopoiéticas (Zhou G-B *et al.*, 2007). Estas células transformadas acumulam-se no local de maturação – a medula – e/ou no sangue periférico (Alves R, 2011).

A classificação actual das neoplasias hematológicas tem em consideração a linhagem celular afectada, a velocidade de progressão da doença e a presença de alterações genéticas, como mutações e translocações (Hoffbrand AC *et al.*, 2011). Assim, a actual reclassificação da OMS das neoplasias mielóides baseia-se em características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das células neoplásicas para determinar a sua linhagem e o grau de maturação, e para definir se a proliferação é normal e eficaz ou displásica e ineficaz. Estes critérios deverão ser avaliados em amostras obtidas antes do início de qualquer tipo de terapêutica. Além da percentagem de blastos no sangue periférico, na MO ou em outros tecidos que possam estar envolvidos, as alterações citogenéticas e genéticas são também importantes na classificação das neoplasias mielóides e na antevisão da sua progressão.

Com a revisão dos critérios de diagnóstico feita pela OMS em 2008, ocorreram algumas alterações em relação à classificação utilizada classicamente: o termo “Doenças Mieloproliferativas” proposto por Dameshek na década de 50, foi substituído pela designação de “Neoplasias Mieloproliferativas” (NMP); a DSM foi incluída na classificação; o algoritmo diagnóstico usado para a PV, TE e MFP foi alterado para incluir informação relativa a mutações activadoras (p.e. JAK2), bem como alterações na histologia da MO como critério de diagnóstico; e ainda critérios relativos à fase acelerada da doença (Swerdlow S *et al.*, 2008).

Assim, segundo a reclassificação da OMS, dentro das neoplasias mielóides são considerados cinco grupos distintos de patologias: as síndromes mielodisplásicas (SMD) e os seus subtipos; as Neoplasias Mieloproliferativas (NMP); a leucemia mielóide aguda (LMA); uma classe onde se sobrepõem síndromes mielodisplásicas/neoplasias mieloproliferativas (SDM/NMP); e as neoplasias mielodisplásicas associadas à eosinofilia e a anomalias moleculares específicas (Tabelas 2 e 3) (Vardiman e Hyjek, 2008).

Tabela 2. Classificação da OMS das Neoplasias Mielóides de 2008.

<p>NMP</p> <ul style="list-style-type: none"> – LMC BCR-ABL positiva – PV – TE – Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC)* – Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC)* – MFP*
<p>SDM/NMP</p> <ul style="list-style-type: none"> – Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC)* – LMC atípica (LMCa)* – Leucemia Mielomelanocítica Juvenil (LMMJ)* – SDM/NMP não classificáveis*
<p>Neoplasias Mielóides e Linfóides com Eosinofilia e anomalias PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1</p> <ul style="list-style-type: none"> – Neoplasias Mielóides e Linfóides associadas com rearranjos do PDGFRA* – Neoplasias Mielóides associadas com rearranjos do PDGFRB* – Neoplasias Mielóides e Linfóides associadas com rearranjos FGFR1*
<p>SDM</p>
<p>LMA e Neoplasias precursoras relacionadas</p>

* São referidas como variantes das NMP (Adaptado de Vardiman e Hyjek, 2008)

Tabela 3. Neoplasias Mielóides: subgrupos principais e características frequentes ao diagnóstico.

Doença	Celularidade da medula	% de blastos da medula	Maturação	Morfologia	Hematopoiese	Contagem de células do sangue	Organo-megálias
NMP	Geralmente aumentada, frequentemente normal na TE	Normal ou levemente aumentados; <10% na fase crónica	Presente	Granulócitos e receptores eritróides normais; megacariócitos anormais	Eficaz	Variável; uma ou mais linhagens inicialmente aumentadas	Frequentes
Neoplasias linfóides/ mielóides com eosinofilia e anomalias de PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1	Aumentada	Normal ou levemente aumentados; <10% na fase crónica	Presente	Relativamente normal	Eficaz	Eosinofilia	Comum
SMD	Aumentada; ocasionalmente normocelular ou hipocelular	Normal ou aumentada; <20%	Presente	Displasia de uma ou mais linhagens mielóides	Ineficaz	Citopenia(s)	Pouco comum
SMD/NMP	Aumentada	Normal ou levemente aumentadas; < 20%	Presente	Frequentemente uma ou mais linhagens displásicas; a LMMJ frequentemente apresenta displasia mínima	Pode variar entre as linhagens	Variável: comum o aumento da contagem leucocitária	Comum
LMA	Normalmente aumentada	Aumentada; $\geq 20\%$ excepto em casos com anomalias citogenéticas específicas ou em alguns casos de eritroleucemia	Varia, geralmente residual	Pode ou não ser associada a displasia de uma ou mais linhagens	Eficaz ou ineficaz	Contagem leucocitária variável; normalmente anemia e trombocitopenia	Pouco comum

(Adaptado de Swerdlow S *et al.*, 2008)

3.2. As neoplasias mieloproliferativas

Em 1951, William Dameshek destacou as semelhanças fenotípicas entre a LMC, a PV, a TE e a MFP e agrupou-as segundo a denominação de doenças mieloproliferativas (DMPs) (Kaushansky K, 2005; Tefferi e Gilliland, 2007). O aspecto comum que une este grupo heterogéneo de neoplasias consiste na sua origem a partir de uma célula progenitora que normalmente produz células de diferenciação terminal da série mielóide, eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas. Devido a esta característica, estas patologias quase sempre afectam inicialmente a MO e os órgãos hematopoiéticos secundários em menor grau (Aster e Kumar, 2000).

Como já foi salientado estas patologias partilham entre si aspectos da sua patogénese mas variam na sua apresentação clínica (Kaushansky K, 2005). Recentemente a OMS inclui neste grupo a LEC, LNC e a DSM (Kaushansky K, 2005; Tefferi e Gilliland, 2007; Swerdlow S *et al.*, 2008).

Como mencionado, as NMPs são distúrbios clonais da célula estaminal hematopoiética (Kaushansky K, 2005; Swerdlow S *et al.*, 2008), resultantes da desregulação da transdução de sinal, como consequência de mutações somáticas adquiridas (Tefferi e Gilliland, 2007) em genes que codificam proteínas com actividade de tirosina cinase (Figuras 6 e 7) (Kaushansky K, 2005).

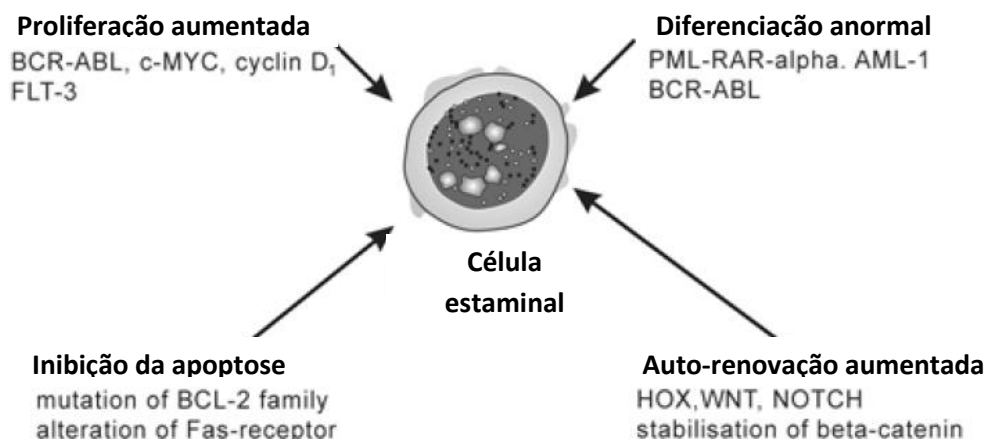


Figura 5 - Mecanismos responsáveis pela transformação maligna da célula estaminal hematopoiética. Estão representados alguns exemplos de genes que causam mudanças do comportamento celular. (Adaptado de Klenner P, 2006).

As NMP são caracterizadas numa fase inicial por uma MO hiperclular com maturação hematopoiética (Campbell e Green, 2006; Swerdlow S *et al.*, 2008) e aumento do número de granulócitos, eritrócitos e/ou plaquetas no sangue periférico. O excesso de células sanguíneas circulantes pode ser sequestrado pelo fígado ou pelo baço, e um quadro de hepatoesplenomegália pode estar presente (Swerdlow S *et al.*, 2008), bem como tendência aumentada para a trombose e hemorragia (Campbell e Green, 2006). Este grupo de neoplasias tem, normalmente, um início insidioso e uma evolução por fases que termina em falência medular devida a hematopoiese ineficaz e mielofibrose ou transformação blástica. A evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é resultado da expansão clonal de mieloblastos na MO, sangue periférico (Sp) ou outros tecidos, que pode atingir uma ou todas as linhagens mielóides. A constatação de mais de 20% de blastos na MO ou Sp é suficiente para o diagnóstico (Swerdlow S *et al.*, 2008).

Com a evolução das técnicas de investigação este grupo de neoplasias foi-se diferenciando entre si. A identificação, em 1973, da presença de um cromossoma 22

encurtado, conhecido como cromossoma Ph, permitiu identificar a LMC. Este cromossoma, observado em doentes com esta patologia, é o produto de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, $t(9:22)(q34;q11)$ (Figura 2). A consequência molecular desta translocação é a formação de um oncogene que codifica uma proteína quimérica BCR-ABL com actividade de tirosina cinase constitutiva aumentada (Druker B, 2008; Quintás-Cardama e Cortes, 2009), a qual é essencial para transformar as células (Druker B, 2008).

Foram identificadas mais alterações moleculares responsáveis pela função anómala de outras proteínas tirosina cinases (PTKs), como mutações nos genes que codificam as cinases Janus (JAK), em particular na JAK2, e que desempenham um papel importante na patogénese da PV, TE e MFP. Foram ainda identificados, em doentes com neoplasias mielóides associadas a eosinofilia, rearranjos em genes que codificam os receptores de tirosina cinase (PTK) dos factores de crescimento derivados das plaquetas alfa e beta (PDGFRA, PDGFRB) e/ou do factor de crescimento dos fibroblastos (FGFR1). Considerando a importância do papel que as PTKs alteradas têm na patogénese da LMC, PV, TE e MFP, faz sentido incluir nesta mesma categoria as proliferações mielóides crónicas relacionadas com anomalias da PTK. Assim, a Mastocitose primária, quase sempre associada à mutação D816V no gene *c-KIT* que codifica um receptor PTK, foi incluída neste grupo. No entanto a patogénese molecular de uma elevada percentagem de casos de TE, MFP, LNC e neoplasias mielóides com eosinofilia continua desconhecida. Por esta razão, aspectos clínicos, laboratoriais e morfológicos são essenciais para o diagnóstico e classificação destas patologias (Swerdlow S *et al.*, 2008).

4. ETIOLOGIA DA LMC

Como referido, a LMC foi a primeira patologia humana em que se considerou que uma anomalia cariotípica específica e consistente poderia estar relacionada a eventos patogénicos de transformação neoplásica (Faderl S *et al.*, 1999). Este cromossoma foi denominado de cromossoma Philadelphia em homenagem à cidade em que foi descoberto. Em 1973 Rowley demonstrou que este cromossoma era fruto de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$. (Druker B, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009). Esta leva à transferência do gene do receptor de tirosina cinase *ABL* para a região do *BCR*, desenvolvendo um gene quimérico que conduz à produção de uma proteína de fusão BCR-ABL com actividade tirosina cinase excessiva, responsável pela proliferação exagerada de um clone autónomo, que sofre maturação. A presença desta translocação prova que a transformação maligna ocorreu a nível da célula estaminal hematopoiética (Klener P, 2006). De facto, a maioria dos doentes com NMP têm uma população clonal de células mielóides e eritróides sugerindo que estas doenças surgem por alteração dos progenitores hematopoiéticos, sendo portanto doenças clonais da célula estaminal hematopoiética.

Parece não existir uma predisposição familiar para o desenvolvimento desta doença (Swerdlow S *et al.*, 2008), não tendo sido encontrada uma correlação clara com a exposição a fármacos citotóxicos, nem evidências que sugiram uma etiologia viral (Hoffbran A *et al.*, 2008; Longo D *et al.*, 2008). Apesar dos factores predisponentes para LMC serem desconhecidos, a exposição a radiação foi considerada em alguns casos (Swerdlow S *et al.*, 2008; Longo D *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009;), visto ter ocorrido um aumento da incidência da doença entre os sobreviventes da bomba atómica (Hoffbrand A *et al.*, 2008; Longo D *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009). No entanto,

não foi encontrado qualquer alteração da taxa de incidência nos sobreviventes do acidente de Chernobyl, sugerindo serem necessárias doses elevadas de radiação para induzir a LMC (Longo D *et al.*, 2008). De facto, a irradiação em alta dose de células da linhagem mielóide *in vitro* induz a expressão de transcritos BCR-ABL indistinguíveis dos da LMC.

Através da utilização de um ensaio de PCR de sensibilidade elevada verificou-se que o gene *BCR-ABL* pode ser detectado em indivíduos saudáveis. Estes achados sugerem que se podem desenvolver com frequência em células hematopoiéticas genes de fusão, no entanto a transformação leucémica é incomum (Hoffman R *et al.*, 2009).

5. BASES GENÉTICAS E MOLECULARES

A translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$, que origina um cromossoma mais pequeno conhecido por cromossoma de Filadélfia (Ph), é a alteração genética considerada a base da fisiopatologia da LMC, e está presente em mais de 95% dos doentes (Faderl S *et al.*, 1999). A consequência molecular dessa translocação é a fusão sequencial do segmento 5' do gene da região do grupo de quebra (*BCR*) no cromossoma 22q11.2 com o segmento 3' do gene do vírus da Leucemia de Abelson (*ABL*) localizado no cromossoma 9q34 (Faderl S *et al.* 1999), com a formação do gene de fusão oncogénico *BCR-ABL* (Figura 2). Este gene quimérico é transcrito num mRNA híbrido de *BCR-ABL*. São produzidas proteínas de fusão, com actividade de tirosina cinase constitutivamente activas, que contém domínios NH₂ terminais de *BCR* e domínios COOH terminais de *ABL*. As proteínas de fusão podem transformar células

progenitoras hematopoiéticas *in vitro*. Estas células alteradas sofrem replicação e a sua descendência possui vantagem proliferativa em relação às células hematopoiéticas normais, originando uma massa volumosa de células leucémicas que gradualmente substitui a MO normal, preenchendo os espaços de gordura e incrustando as áreas medulares dos ossos longos, sem contudo destruir as células estaminais hematopoiéticas residuais. Este aumento da mielopoiese envolve preferencialmente os granulócitos, mas a contagem de megacariócitos e de plaquetas também pode aumentar. (Hoffbrand A *et al.*, 2008; Longo D *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009).

No entanto, em doentes com LMC sem aparentes anomalias kariótípicas, cerca de um terço possui um oncogene *BCR-ABL* citogeneticamente oculto, normalmente localizado a um cromossoma 22 com aparência normal (Hoffman R *et al.*, 2009).

Além disso, a análise por microscopia óptica de amostras de MO de doentes com LMC mostra que o número de células progenitoras (CFU-GEMM, BFU-E e CFU-GM) está aumentado em comparação com a MO normal, e este aumento é mais marcado no Sp que na medula de doentes não tratados. Por outro lado, o número de BFU-E e CFU-GM correlaciona-se com a contagem de leucócitos. Esta vantagem proliferativa dos progenitores mielóides poderá ser devida a resposta aumentada a factores de crescimento hematopoiéticos e/ou a perda de sensibilidade a factores inibitórios. Nesse sentido, foram efectuados estudos para averiguar a resposta de progenitores de LMC aos factores de crescimento hematopoiéticos, nomeadamente ao factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), ao factor estimulador de colónias granulócitos-monócitos (GM-CSF), à interleucina 3 (IL-3), ao factor de crescimento da célula estaminal hematopoiética (SCF) e à eritropoietina. Existem algumas evidências que a proliferação autónoma pode ser devida ao circuito autócrino envolvendo o G-CSF e a IL-3 (Hoffbrand A *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009).

Foi também demonstrado que as células leucémicas exibem adesão defeituosa às células estromais da medula e à matriz extracelular, provavelmente por possuírem uma anomalia numa integrina ou por ausência de uma proteína de fixação, mas estes mecanismos continuam por esclarecer. No entanto, é possível que a excessiva proliferação que se observa na LMC seja devida, em parte, à fuga prematura do “nicho” de células estaminais e à influência dos efeitos inibitórios fisiológicos (Hoffbrand A *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009).

5.1. Anatomia molecular da translocação BCR-ABL

O gene *ABL* (*Abelson Leukemia*) localizado no cromossoma 9q34.1 é o homólogo humano do oncogene viral, *v-ABL*, transportado pelo vírus da leucemia de Abelson. Possui 11 exões e abrange mais de 230 kb (kilobases). Codifica uma tirosina cinase citoplasmática (*nonreceptor*) com peso molecular de 145 kDa (kilodaltons), a proteína ABL.

Existem duas isoformas deste gene, decorrentes de *splicing* alternativo, que podem ser localizados ao citoplasma e ao núcleo, influenciando a proliferação/sobrevivência celular e a apoptose, respectivamente. A mutação deste gene mais estudada é a *BCR-ABL* (Faderl S *et al.*, 1999; Deininger M *et al.*, 2000; Tefferi e Gilliland, 2007).

A proteína ABL possui três domínios com homologia SRC (SH1 a SH3) que estão localizados no terminal amínico (Figura 6). O domínio SH1 transporta a função de tirosina cinase, enquanto os domínios SH2 e SH3 são domínios reguladores e permitem a interação com outras proteínas (Faderl S *et al.*, 1999; Deininger M *et al.*, 2000; Tefferi e Gilliland, 2007). Apresenta duas isoformas que se distinguem pelo seu

tamanho e localização: a isoforma A, que se encontra no citoplasma, é ligeiramente mais pequena pois não apresenta o local de miristoilação, contrariamente à isoforma B, localizada no núcleo (Hoffman R *et al.*, 2009). Esta proteína tem um papel complexo na célula, integra sinais de várias fontes intra e extracelulares, desempenhando várias funções fisiológicas que incluem a regulação do ciclo celular, a resposta celular a stresse genotóxico e a transmissão de informação celular através da sinalização de integrinas. É importante salientar que estes dados foram obtidos de estudos em fibroblastos e não em células hematopoiéticas, não tendo uma aceitação generalizada.

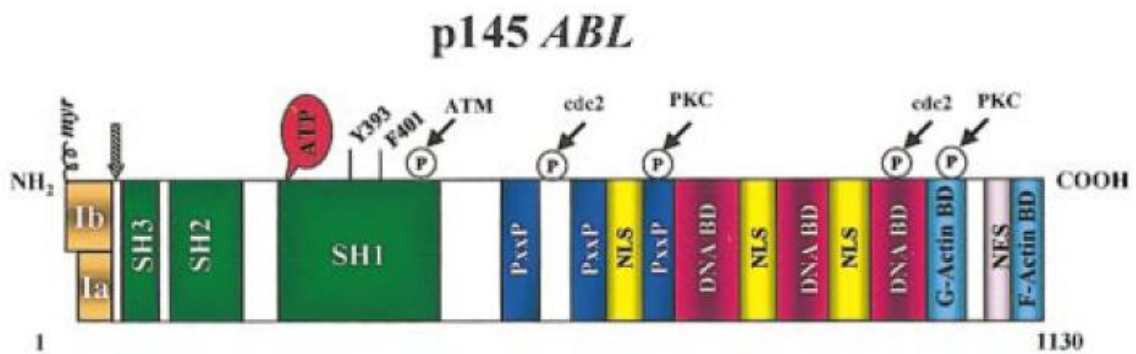


Figura 6. Estrutura da proteína ABL. A isoforma Ia é ligeiramente mais curta que a Ib. De notar, os 3 domínios de homologia SRC (SH) situados no terminal NH₂. Y393 é o local *major* de autofosforilação dentro do domínio cinase, e a fenilalanina 401 (F401) está conservada nas proteínas tirosina cinases contendo o domínio SH3. Na porção média é visível uma região rica em prolina (PxxP) capaz de se ligar ao domínio SH3, e abriga 1 dos 3 sinais de localização nuclear (NLS). O terminal carboxílico contém ADN e domínios de ligação de actina G e F. São visíveis os locais de fosforilação pela Atm, cdc2, PKC. As setas indicam os pontos de quebra na proteína de fusão BCR-ABL. (Adaptado de Deininger M *et al.*, 2000).

O gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), localizado no cromossoma 22 (22q11), tem um tamanho total de 135 kb, e possui vários motivos funcionais (Deininger, MWN *et al.*, 2000; Tefferi, A e Gilliland, DG 2007). Apesar da função

deste gene não estar ainda completamente esclarecida, sabe-se que codifica uma proteína de 160 KDa, com actividade de cinase de serina-treonina, que contém múltiplos domínios modulares, designada por p160 ou BCR (Hoffbrand V *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009). Na porção N terminal (NH₂) encontra-se o domínio de oligomerização *coiled-coil* que é essencial para a polimerização com outras proteínas e o domínio catalítico com função de cinase serina-treonina. Na região central localiza-se o domínio GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*), que funciona como um elemento de controlo para a família das proteínas RAS, uma vez que codifica um factor de troca de guanosinas (GDP-GTP), o GEF, cuja função é mediar a activação da RHO, uma proteína envolvida na activação de factores de transcrição, como o NF-κB (Figura 7) (Faderl S *et al.*, 1999; Advani, AS *et al.* 2002). No terminal carboxílico (COOH), encontra-se o domínio GAP (*GTPase Activating Protein*) que codifica uma GTPase que regula a proteína RAC, que se encontra envolvida na regulação da polimerização da actina e da actividade da NADPH oxidase das células fagocíticas (Advani, AS *et al.*, 2002) (Figura 7).

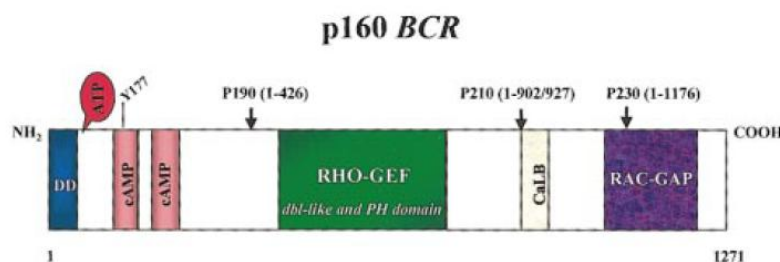


Figura 7. Estrutura da proteína BCR. No terminal NH₂ é visível o domínio de dimerização (DD) e dois domínios homólogos da cinase de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). Y177 é o local de autofosforilação crucial à ligação com o Grb-2. Na região central é visível a região homóloga aos factores de troca de nucleótidos de guanina, Rho (Rho-GEF), assim como o domínio de homologia tipo-dbl e *pleckstrin* (PH). Na vizinhança do terminal COOH está representado o local para a ligação lipídica cálcio-dependente (CaLB) e um domínio para a função de activador Rac-GTPase (Rac-GAP). As setas indicam os locais de quebra na proteína de fusão BCR-ABL (*Adaptado de Deininger M et al.*, 2000).

Da translocação entre o cromossoma 9 e o cromossoma 22 resulta a justaposição do gene *BCR* com o gene *ABL*, tendo como consequência o gene de fusão *BCR-ABL* (Hehlmann R *et al.*, 2007).

Os pontos de quebra no cromossoma 9 ocorrem, usualmente, no sentido 5' do exão 2 do gene *ABL* e envolvem uma extensa região (mais de 300kb). De notar, que o exão 1 do gene *ABL* nunca faz parte do mRNA quimérico (Deininger M *et al.*, 2000). Contrariamente, os pontos de quebra no cromossoma 22 estão agrupados em 3 regiões do gene *BCR* bem mais pequenas que as do gene *ABL*, sendo a mais frequente a região de quebra *major* (M-bcr com 5.8 kb entre os exões 12 e 16) que, por *splicing* alternativo, origina transcritos de fusão com as junções e13a2 ou e14a2 que produzem uma proteína de 210 kDa (p210). Numa pequena percentagem de casos o ponto de quebra localiza-se numa área com 54.4 kb, a montante do M-bcr, entre os exões e2' e e2 (região de quebra *minor* ou m-bcr) que gera um transcrito e1a2 traduzido numa proteína de fusão de p190 KDa. Existe um terceiro ponto de quebra (μ -bcr), abaixo do exão 19, que origina uma proteína de fusão de p230 KDa, que está normalmente associado a LNC (Figura 8) (Faderl S *et al.*, 1999; Tefferi e Gilliland, 2007; Quintás-Cardama e Cortes; 2009).

Em termos funcionais, as diferentes oncoproteínas derivadas do gene fusão apresentam actividade de tirosina cinase desregulada e agressividade distinta (Walz e Sattler, 2006). Assim, a forma menos agressiva corresponde ao transcrito μ -bcr, seguido da forma M-bcr, correspondendo o transcrito m-bcr à forma mais agressiva. A identificação das vias de sinalização celular alteradas pela actividade desta oncoproteína é de vital importância para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na sua patogenezidade (Walz e Sattler, 2006).

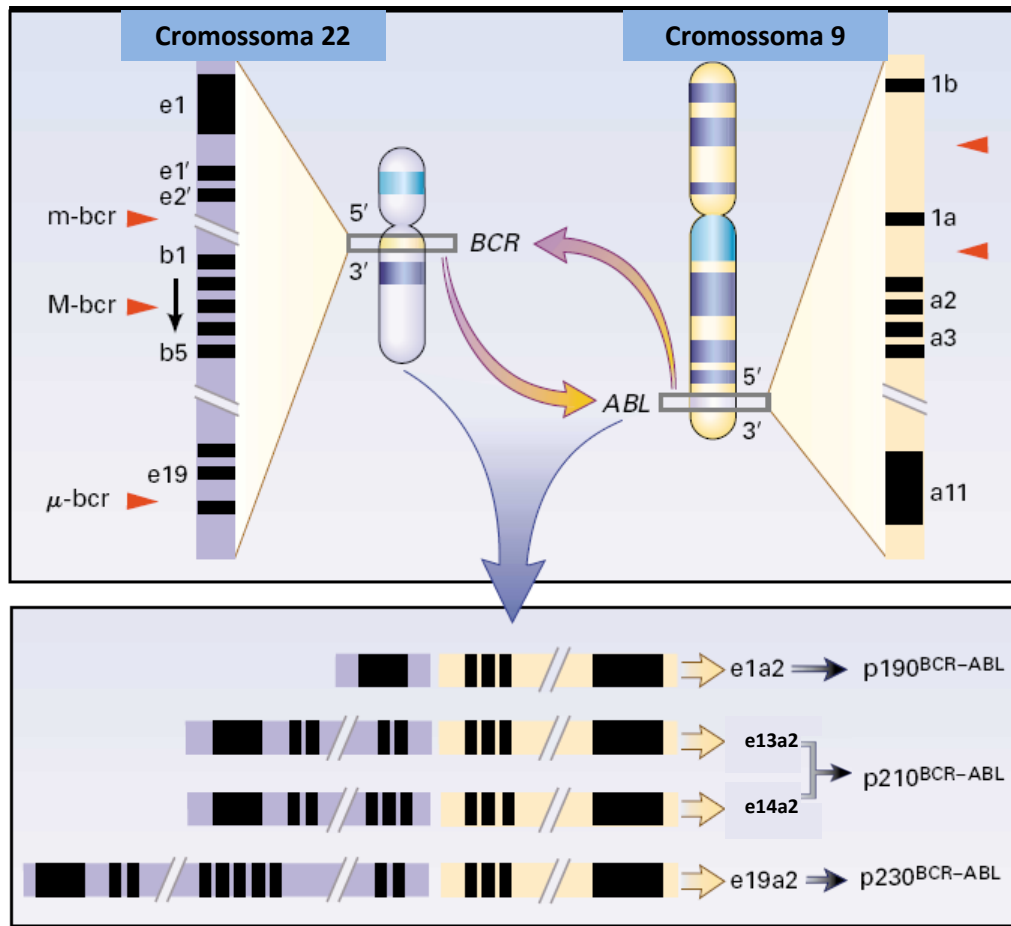


Figura 8. A translocação $t(9;22)(q34q11)$ na LMC. Os pontos de quebra (assinalados com as setas vermelhas) no gene *ABL* estão localizados, na maioria dos casos, no sentido 5' do exão a2. No gene *BCR* foram localizados vários pontos de quebra. Dependendo dos pontos de quebra envolvidos, segmentos do gene *BCR* de diferentes tamanhos fundem-se com as sequências do gene *ABL*, resultando em moléculas de mRNA (e1a2, e13a2, e14a2, e19a2) de diferentes tamanhos que são transcritos em proteínas quiméricas (p190, p210 e p230) com peso molecular e função variável (Adaptado de Faderl S et al., 1999).

Baseado no facto que, a porção *ABL* na proteína quimérica é quase invariavelmente constante, enquanto que a porção do *BCR* varia bastante, poderá deduzir-se que o *ABL* tem maior probabilidade de transportar o princípio modificador enquanto as diferentes sequências de *BCR* podem ditar o fenótipo da doença (Deininger M et al., 2000).

Uma das questões que ainda não obteve uma resposta consensual é saber qual o evento responsável para que a translocação ocorra. Como já foi referido, a exposição a radiação ionizante é um factor de risco para o desenvolvimento desta doença. Aliás, os transcritos *BCR-ABL* podem ser induzidos em células hematopoiéticas através da sua exposição a radiação ionizante *in vitro*. Estudos recentes demonstraram que a distância física entre os genes *BCR* e *ABL* nos linfócitos humanos e células CD34⁺ é mais curta do que se esperava, podendo esta proximidade favorecer eventos de translocação entre ambos os genes (Deininger M *et al.*, 2000).

No entanto, não existe consenso de que a presença da translocação *BCR-ABL* seja suficiente para induzir a doença. Deininger *et al* (2000) defendem que esta, por si só, não é suficiente para causar a LMC, visto que transcritos de M-bcr e m-bcr são detectáveis, em baixa frequência, em amostras de Sp de indivíduos saudáveis, não estando esclarecido a razão do desenvolvimento da doença numa pequena percentagem de indivíduos. Poderá ser possível que a translocação ocorra em células comprometidas com a diferenciação terminal, que são, portanto, eliminadas ou que uma resposta imune suprime ou elimina as células que expressam *BCR-ABL*. Evidências indirectas de que tais mecanismos possam ser relevantes são obtidas através da observação de que certos tipos HLA protegem os indivíduos da LMC. Já Hoffman *et al* (2009) defendem a ideia oposta, afirmando que, segundo as evidências, a formação do gene de fusão *BCR-ABL* em células estaminais hematopoiéticas é suficiente para originar a LMC.

Segundo Faderl *et al* (1999) as evidências do papel dos transcritos *BCR-ABL* como mediadores centrais da proliferação mielóide e transformação leucémica decorrem de estudos realizados em modelos *in vivo* e *in vitro*, onde a transposição de transcritos *BCR-ABL* causam crescimento tumoral em linhas celulares hematopoiéticas e podem gerar uma síndrome semelhante à LMC em modelos animais.

Na presença do cromossoma Ph, um RNA mensageiro (mRNA) quimérico, contendo uma de duas junções do *BCR-ABL* designadas de e13a2 e e14a2 (Hoffman R *et al.*, 2009), é transcrito e subsequentemente traduzido num produto, a proteína BCR-ABL (a p210) de 210 Kda, como referido. Esta proteína é exclusivamente citoplasmática e exhibe uma actividade de tirosina cinase anómala que leva à mobilização de factores de proliferação e anti-apoptóticos com consequente proliferação maligna (Tefferi e Gilliland, 2007; Hoffman R *et al.*, 2009). Na proteína p210 a actividade de tirosina cinase é constitutivamente activada pela justaposição do terminal amínico (N) do *BCR*. Este actua promovendo a dimerização proteica, conduzindo à fosforilação de resíduos de tirosina e à activação constitutiva da actividade de cinase. Esta fusão das sequências de *BCR* ao *ABL* adiciona novos domínios de regulação ao *ABL*. A actividade de tirosina cinase incontrolável e a interacção aumentada com várias proteínas efectoras leva à desregulação dos mecanismos de sinalização celular que regulam a proliferação celular (Hoffman R *et al.*, 2009).

Análises mutacionais identificaram diversos domínios na proteína quimérica que regulam a actividade de cinase ou que estão ligados a outras vias de sinalização a jusante, e que são essenciais à transformação celular maligna (Figura 9). Como já foi referido, a proteína ABL contém domínios SH2 e SH3, um domínio de ligação da actina, um de ligação ao DNA, 3 sinais de localização nuclear e 1 sinal de exportação nuclear, que determina a localização subcelular da proteína ABL, em resposta a estímulos ambientais. A proteína BCR também exhibe uma organização espacial complexa que inclui o domínio de oligomerização *coiled-coil* (CC) amino-terminal, um domínio de cinase de serina-treonina, um domínio de homologia do factor de troca de nucleotídeos de guanina, Dbp/CDC24, um local de ligação lipídico dependente de cálcio e um domínio activador da proteína RAC guanósina trifosfato (Qintás-Cardama e

Cortes, 2009), a tirosina na posição 177 e a sequência rica em fosfoserina-treonina localizada entre os aminoácidos (aa) 192-242 e 298-413 (ver figura 7) (Deininger M *et al.*, 2000).

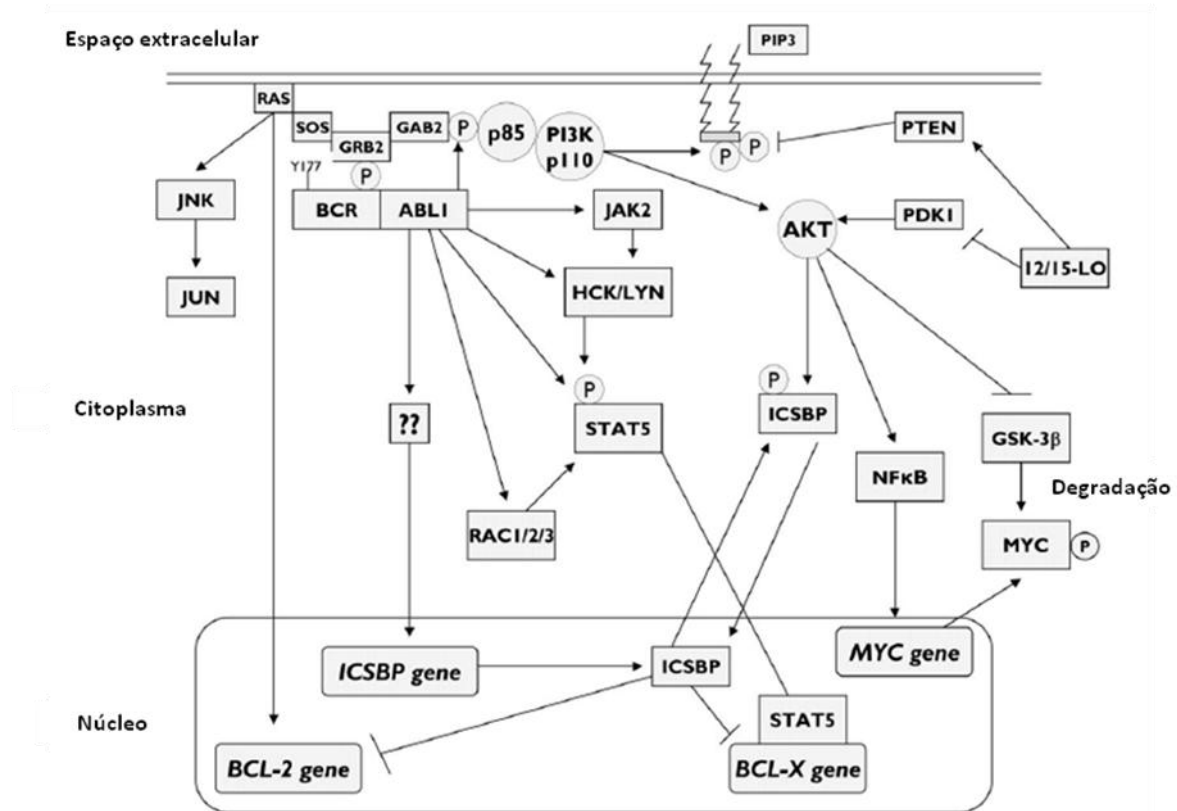


Figura 9. Vias de sinalização molecular intracelulares em progenitores mielóides BCR-ABL positivos. O resíduo de Tyr177 fosforilado da proteína BCR serve como local de “encaixe” para a proteína adaptadora GRB2 que se une à proteína de ligação 2 associada ao GRB2 (GAB2) assim como o SOS (um trocador de nucleótidos de guanina associado à proteína RAS), resultando na activação da via RAS-MAPK, que termina na transcrição do gene BCL-2. Após a fosforilação pelo BCR-ABL, o GAB2 recruta a cinase-3 do fosfatidilinositol (PI3K) que activa a proteína AKT. Esta activação resulta no aumento da transcrição do gene MYC e estabilização da proteína MYC através da inibição da sua degradação pela GSK-3β. A BCR-ABL activa também o factor de transcrição STAT5, directa e indirectamente através da activação das cinases JAK2, SRC, HCK e LYN. O resultado final é a activação da transcrição do gene BCL-X. Contrariamente, a proteína BCR-ABL anula a transcrição do ICSBP (*interferon consensus sequence binding protein*) através de um mecanismo desconhecido, libertando a inibição da transcrição do gene BCL-2 e BCL-X mediada pelo ICSBP, conduzindo ao aumento sobrevivência dos progenitores mielóides. O mesmo efeito é obtido pela 12/15 lipoxigenase (12/15-LO), que pode inibir a PDK1 ou activar a PTEN (ambos reguladores da ATK),

originando aumento de fosforilação do ICSBP. O resultado final da activação da cinase BCR-ABL é a promoção da proliferação celular e sobrevivência. As setas indicam as interacções directas e/ou activações. GSK-3 β , cinase 3 β glicogénio sintetase; PIP₃, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. (*Adaptado de Quintás-Cardama e Cortes, 2009*).

O domínio de oligomerização *coiled-coil* (CC) amino-terminal é um activador importante da actividade de cinase da proteína ABL, promovendo a associação do BCR-ABL com fibras de F-actina (Faderl S *et al.*, 1999). Como mencionado, a fosforilação do BCR na tirosina 177 gera um local de ligação GRB2, que é importante para a activação da proteína RAS. A presença de uma mutação que origina a substituição do resíduo de tirosina 177 para fenilalanina (Y177F) anula a sua capacidade de se ligar ao GRB2, afectando a actividade tirosina cinase. O domínio SH2 e o local de fosforilação de tirosina no nó de activação do domínio de cinase da proteína ABL também concorrem para a activação RAS. Alguns domínios de BCR-ABL poderão ter funções sobrepostas ou complementares.

Várias proteínas sinalizadoras estão fosforiladas em células que expressam BCR-ABL e/ou interagem com o BCR-ABL através de vários domínios funcionais. Estas podem activar vias de sinalização por vários mecanismos incluindo as proteínas RAS, PI3K, AKT, JNK, a família de cinases SRC, proteínas fosfatase, factores de transcrição STATs, factor B nuclear e MYC. O gene BCR-ABL induz, ainda, a expressão de algumas citocinas como a IL-3, G-CSF e GM-CSF. Foram encontradas evidências que a desregulação da ICSBP (*IFN consensus sequence-binding protein*) tem um papel importante na patogénese da LMC (Hoffman R *et al.*, 2009).

5.2. *Mecanismos de transformação maligna*

Três mecanismos foram implicados na transformação maligna induzida pelo *BCR-ABL* nomeadamente, alteração das propriedades de adesão às células do estroma e à matriz extracelular, sinalização mitogénica constitutivamente activa e redução da apoptose.

A adesão celular é um dos mecanismos de controlo da proliferação celular mas, como já foi referido, as células progenitoras da LMC exibem uma capacidade de adesão diminuída. Estas células expressam uma variante da integrina $\beta 1$, que exhibe um sinal inibitório da adesão celular. Recentemente foi demonstrado que, a tirosina cinase BCR-ABL aumenta a expressão de um mRNA da integrina $\alpha 6$, o que sugere que a activação da transcrição é outro mecanismo com relevância na sinalização das integrinas (Deininger M *et al.*, 2000). Apesar de existirem evidências de que a sinalização mediada pela proteína BCR-ABL influencia a função das integrinas, é no entanto difícil de determinar qual a sua consequência biológica.

Na figura 10 estão representados as diferentes vias de sinalização com potencial mitogénico nas células *BCR-ABL* positivas. Como podemos observar, as vias activadas por esta oncoproteína incluem, entre outras, a via das proteínas RAS/RAF/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e da JAK/STAT (*Just Another Kinase – Signal transducer and activation of transcription*) (Deninger M, 2000; Druker B, 2008; Quintas-Cardama e Cortes, 2009).

A molécula iniciadora da cascata RAS/MAPK, a proteína RAS, é um dos substratos conhecidos do gene fusão, gerando proliferação descontrolada das células leucémicas. Apesar da demonstração da activação constitutiva da proteína RAS na patogénese das leucemias Ph positivas, as mutações são incomuns (Deininger M *et al.*, 2000).

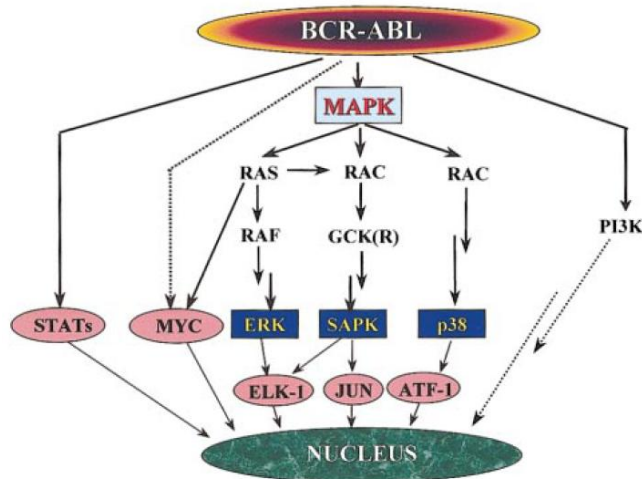


Figura 10. Vias de sinalização com potencial mitogénico nas células BCR-ABL positivas. A activação das vias individualmente depende do tipo de célula, no entanto as cinases MAP parecem ter um papel central. A activação da p38 foi demonstrada apenas nas células *v-ABL* transformadas. ATF (*Activating Transcription Factor*), GCK(R) (*Germinal Center Kinase Related*), ELK1 (*ETS-like transcription factor 1*), ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinases*), SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*), STAT (*Signal Transducer and Activation of Transcription*) (Adaptado de Deininger M *et al.*, 2000).

Também a via JNK/SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*), que é activada pela BCR-ABL, foi demonstrada como sendo necessária à transformação celular maligna. Assim, a sinalização da RAS poderá ser retransmitida através do factor de troca GTP-GDP, a proteína RAC, para o GCKR (*Germinal Center Kinase Related*) e posteriormente para as proteínas JNK/SAPK (ver figura 10). Pensa-se que a proteína **p38** também se encontra activa nas células BCR-ABL positivas (Deininger M *et al.*, 2000).

As primeiras evidências do envolvimento da via de sinalização JAK-STAT foram obtidas através de estudos em células B transformadas pelo *v-ABL*. A fosforilação constitutiva dos factores de transcrição STATs (Stat1 e Stat5) foram observadas em várias linhas celulares BCR-ABL positivas e em culturas primárias de células de LMC,

nas quais a activação STAT5 parece ter um papel anti-apoptótico, contribuindo para a transformação maligna.(Deininger M *et al.*, 2000).

Por outro lado, a actividade da **cinase PI3** é essencial à proliferação de células BCR-ABL positivas. O *BCR-ABL* forma um complexo multimérico com a cinase PI3, CBL e as moléculas adaptadoras CRK e CRKL (*CRK-like protein*), no qual a cinase PI3 é activada. Um outro substrato importante desta cascata é a serina-treonina cinase Akt, a qual parece estar implicada nas vias de sinalização anti-apoptóticas, uma vez que inactiva a proteína pró-apoptótica BAD (Deininger M *et al.*, 2000).

Por outro lado, a sobreexpressão da **via MYC** foi demonstrada em diversas neoplasias. A sua activação pela BCR-ABL é dependente do domínio SH2, embora a ligação entre ambas seja ainda desconhecida. Parece provável que o efeito do gene *MYC* nas células Ph positivas não seja diferente do de outras neoplasias. Dependendo do contexto celular, o gene *MYC* pode activar vias apoptóticas ou proliferativas, sendo provável que a sua função apoptótica seja contrabalançada na LMC através de outros mecanismos, como a via de sinalização PI3 (Deininger M *et al.*, 2000).

Por último, a inibição da apoptose e o seu papel na transformação maligna tem sido referenciado como um dos mecanismos envolvidos no cancro. Diversos estudos demonstram que as linhas celulares de LMC são resistentes à apoptose, não sendo o mecanismo biológico subjacente completamente compreendido. É possível que o *BCR-ABL* bloqueie a libertação mitocondrial de citocromo C e, conseqüentemente, a activação de caspases, podendo este mecanismo ser mediado pela família de proteínas BCL-2. Como já foi mencionado, o gene *BCL-xL* é activado transcripcionalmente pelo STAT5 nas células Ph positivas. A fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD pode também estar implicada neste mecanismo. É também possível que a apoptose seja

inibida pela sub-regulação da ICSBP (*Interferon Consensus Sequence Binding Protein*) (Deininger M *et al.*, 2000).

Fica claro que as múltiplas vias de sinalização iniciadas pela BCR-ABL possuem propriedades proliferativas e anti-apoptóticas que são difíceis de demarcar. No entanto, parece provável que este balanço se altere no sentido da inibição da apoptose enquanto, simultaneamente, fornece estímulos proliferativos (Deininger M *et al.*, 2000; Quintás-Cardama e Cortes, 2009).

O conhecimento das diferentes vias de sinalização envolvidas na LMC, não só permite caracterizar melhor a etiopatogenia e evolução da doença, como identificar possíveis alvos terapêuticos e/ou alvos complementares à oncoproteína BCR-ABL, com o intuito de melhorar a eficácia do tratamento nas neoplasias hematológicas BCR-ABL positivas (Kantarjian H *et al.*, 2007).

5.3. Progressão para crise blástica

Os mecanismos responsáveis pela transformação e progressão da LMC para crise blástica são complexos e apenas parcialmente compreendidos (Quintás-Cardama e Cortes, 2009). Pensa-se que está associada a uma susceptibilidade aumentada do clone *BCR-ABL* a desenvolver alterações moleculares adicionais, uma vez que é frequente encontrar alterações citogenéticas e moleculares adicionais em doentes com LMC em fase de progressão (Hoffman R *et al.*, 2009). Uma questão importante a esclarecer é o porquê do aparecimento destas lesões adicionais. Segundo Deininger *et al* (2000), a presença do gene *BCR-ABL* aumenta a taxa de mutações no *loci* genómico da Na-K-ATPase e HPRT (*Human Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*), ambos usados como marcadores para medir a frequência de mutações. Além disso, a proteína p210

fosforila e interage com a proteína Xeroderma pigmentosum do grupo B (XPB), conduzindo à redução da função catalítica da proteína XPB e, conseqüentemente, ao comprometimento da reparação do ADN. Neste estudo é também referida a possibilidade do efeito anti-apoptótico da proteína BCR-ABL a qual ao favorecer a deficiente reparação do ADN levaria à apoptose em células normais. No entanto, não existem dúvidas de que uma proliferação excessiva e um alto *turnover* celular, por si só, são factores de risco ao desenvolvimento de lesões genéticas adicionais (Deininger M *et al.*, 2000).

Em aproximadamente 50 a 80% dos doentes em CB têm sido encontradas alterações genéticas adicionais nas células leucémicas. As alterações citogenéticas *minor* incluem monossomias dos cromossomas 7, 17 e Y; trissomias dos cromossomas 17 e 21 e translocação t(3;21)(q26;q22). As alterações *major* incluem trissomia 8 (a mais comum), isocromossoma do braço longo do cromossoma 17, i(17q), trissomia 19 e um cromossoma Ph extra (Faderl, S *et al.*, 1999). Podem também estar presentes mutações pontuais nos genes supressores tumorais, *TP53* e *RB*; e sobre-expressão de genes como o *EVII* e *MYC* (Deininger M *et al.*, 2000). Estas observações sugerem que o bloqueio da diferenciação mielóide observado na CB pode abarcar uma cooperação entre o gene de fusão *BCR-ABL* e defeitos nos reguladores da transcrição hematopoiética (Hoffman R *et al.*, 2009).

6. DIAGNÓSTICO

6.1. Caracterização clínica

Os sinais e sintomas característicos à apresentação incluem fadiga, perda ponderal, suores, anemia, hemorragia (gengivas, intestinos, tracto urinário) ou púrpura, desconforto abdominal, saciedade precoce e sensação de uma massa no quadrante abdominal superior esquerdo (Tabela 4). Na maioria dos casos a doença é detectada como resultado de um hemograma de rotina realizado por razões não relacionadas, e um quinto dos doentes encontra-se assintomático ao diagnóstico. Pode, no entanto ser palpável uma esplenomegália (Figura 11), mesmo antes do desenvolvimento dos sintomas (Provan D, 2003). A sintomatologia estabelece-se de uma forma gradual durante semanas ou meses.

Tabela 4. Características clínicas ao diagnóstico em doentes com LMC.

<p>Comuns</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fadiga - Perda ponderal - Suores - Anemia - Hemorragia, hematomas ou equimoses - Esplenomegália com ou sem hepatomegália
<p>Raras</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enfarte esplénico - Leucostase - Hemorragia retiniana - Priapismo - Febre

(Adaptado de Provan D, 2003)

Por outro lado, na primeira fase da doença, a presença de febre sem foco, adenopatias, distúrbios visuais por leucostase ou hemorragia retiniana, dor abdominal aguda devida a enfarte esplénico, priapismo, hipermetabolismo e hiperuricémia, são manifestações raras (Tabela 4) (Hoffman R *et al.*, 2009).



Figura 11. Doente com Leucemia Mielóide Crónica em fase crónica apresentando esplenomegália massiva. (Adaptado de Provan D, 2003).

O exame físico é pobre, podendo ser observado palidez e esplenomegália. O aumento do volume esplénico está presente, ao diagnóstico, em cerca de 90% dos doentes mas, a sua frequência tem vindo a diminuir pois a patologia é detectada cada vez mais precocemente. O fígado pode estar aumentado mas com um bordo macio de difícil delimitação. Equimoses de diferentes tamanhos e tempos de evolução que podem formar pequenos nódulos cutâneos, também podem ser encontrados (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

Em fases mais avançadas da doença pode-se desenvolver fragilidade óssea e sinais infecciosos (febre e leucocitose). Durante a transformação blástica, a esplenomegália é frequente e pode ser dolorosa, existe uma hepatomegália significativa e os doentes podem desenvolver febre, múltiplas adenopatias e, raramente, lesões ósseas líticas (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

6.2. Caracterização laboratorial

O diagnóstico de LMC pode ser colocado num doente que apresenta sintomatologia de carácter inespecífico e dor localizada ao hipocôndrio esquerdo e cujo hemograma apresenta aumento da massa de glóbulos brancos, ou seja, aumento do número absoluto de leucócitos no sangue (normalmente superior a $50 \times 10^9/L$), principalmente à custa de granulócitos imaturos e maduros (Figura 11) (Mehta e Hoffbrand, 2005; Hoffbrand A *et al.*, 2008).

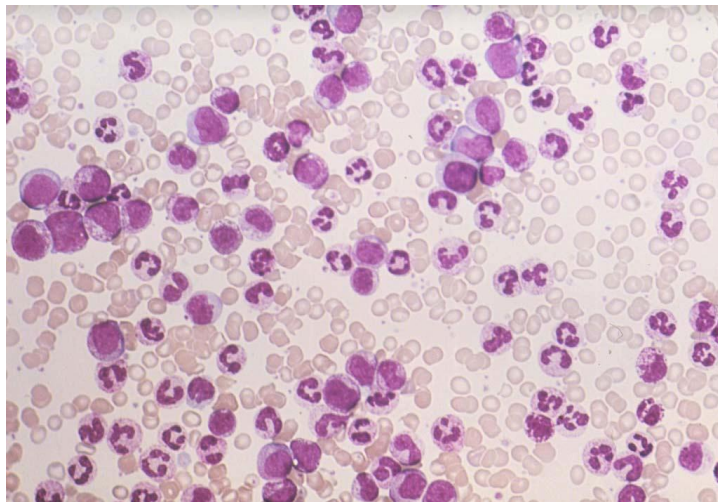


Figura 12. Esfregaço de sangue periférico de um doente com Leucemia Mielóide crónica. Visualiza-se leucocitose acentuada à custa da série mielóide com células em vários estádios de maturação (metamielócitos e mielócitos)

Além da leucocitose, as primeiras alterações laboratoriais encontradas podem incluir, trombocitose e anemia normocítica e normocrômica (Longo D *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009).

Ao diagnóstico o número total de leucócitos encontra-se sempre elevado, normalmente acima de $25 \times 10^9/L$ (mais frequentemente superior a $50 \times 10^9/L$, como referido), e aumenta progressivamente na ausência de tratamento (Hoffman R *et al.*, 2009).

Como se pode observar na Figura 12, uma amostra de sangue periférico revela uma fórmula leucocitária com granulócitos em todas as fases de diferenciação, com aparência normal, sendo a percentagem de blastos habitualmente entre os 5 e os 10% (Longo D *et al.*, 2008). Podem ser encontradas ligeiras anomalias dos neutrófilos, mas estas não estão associadas ao aumento da susceptibilidade infecciosa. Normalmente não existe uma alteração na proporção de eosinófilos, no entanto o seu valor absoluto está aumentado. O número de basófilos é, na maioria dos casos, superior ao normal. Pode também observar-se uma mastocitose e aumento dos linfócitos, em particular das células T (Hoffman R *et al.*, 2009).

A trombocitose é descrita em 50% dos indivíduos, mas o número de plaquetas pode aumentar durante a FC e a disfunção plaquetar pode ocorrer, embora os casos de trombose ou hemorragia sejam raros. A diminuição da contagem plaquetar é sinal de progressão para FA (Hoffman R *et al.*, 2009).

O hematócrito está diminuído na maioria dos doentes e as hemácias revelam pequenas alterações como aumento da variabilidade da forma e tamanho. No esfregaço de sangue periférico pode se observar glóbulos vermelhos nucleados e reticulocitose ligeira (Hoffman R *et al.*, 2009).

Em termos de análise bioquímica os doentes com LMC sem tratamento, podem apresentar hiperuricosúria e hiperuricemia, por vezes com formação de cálculos de uratos que, em doentes predispostos, pode levar ao desenvolvimento de artrite gotosa ou nefropatia úrica. Os níveis séricos de vitamina B12 e a capacidade de fixação desta vitamina estão aumentados, devido à libertação de Trascobalamina I e II pelos neutrófilos. O valor da desidrogenase do lactato (LDH) encontra-se acima dos valores de referência. Poderá observar-se, ainda, pseudo-hipercaliémia devida à libertação pelas plaquetas do potássio intracelular ou, menos frequentemente, pelas células da linha branca após a colheita da amostra. Os valores de fosfatase alcalina (FA) são baixos ou normais em 90% dos doentes, contudo o seu valor pode aumentar em resposta a infecção e a inflamação (Longo D *et al.*, 2008; Hoffman R *et al.*, 2009). É importante salientar que estas alterações não são específicas desta patologia (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

Como já foi referido anteriormente estamos perante uma patologia rara em grupos etários mais jovens, mas, neste grupo a doença não difere biologicamente da doença do adulto, apresentando manifestações clínicas e evolutivas semelhantes. A principal diferença observada foi a contagem leucocitária mais elevada no grupo pediátrico em relação às descritas em adultos (Lee M, 2008).

O exame microscópico da MO revela hiper celularidade, com 75 a 90% de celularidade medular. A relação granulócitos/eritrócitos aumenta de 10:1 para 30:1, com granulopoiese aumentada e diminuição da eritropoiese. A percentagem de blastos é inferior a 5%, no entanto a presença de mais de 10% indica transformação para FB. O número de megacariócitos pode ser normal ou ligeiramente aumentado, e estes são mais pequenos e podem apresentar um núcleo hipolobulado. A coloração de prata revela um aumento da deposição de fibras de colagénio tipo III. O aumento da fibrose medular

poderá estar associado com o aumento do volume esplénico, a anemia e o aumento de blastos no sangue periférico e na medula. Em 30% das amostras, são encontrados células Pseudo-Gaucher e histiócitos azuis, secundários ao aumento do *turnover* celular (Hoffman R *et al.*, 2009).

O estudo microscópico de amostras de tecido esplénico revela infiltração das cordas da polpa vermelha por granulócitos em diferentes fases de maturação. A nível hepático observa-se infiltração a nível dos sinusóides hepáticos e na área portal (Hoffman R *et al.*, 2009).

Durante a transformação blástica observa-se alteração das provas funcionais hepáticas e aumento do valor sérico de ácido úrico. A hipercalcémia por vezes encontrada é devida ao aumento da actividade osteoclástica (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

6.3.Caracterização citogenética

O diagnóstico definitivo de LMC exige a demonstração da presença do cromossoma Ph, em resultado da translocação t(9,22), por citogenética convencional e/ou por FISH (Figura 13), ou do gene de fusão *BCR-ABL1*, por qRT-PCR (Lucas *et al.*, 2011). Os resultados obtidos com estas técnicas têm sido usados como factor distintivo entre o diagnóstico de LMC e outras doenças mieloproliferativas (Slater D *et al.*, 2005).

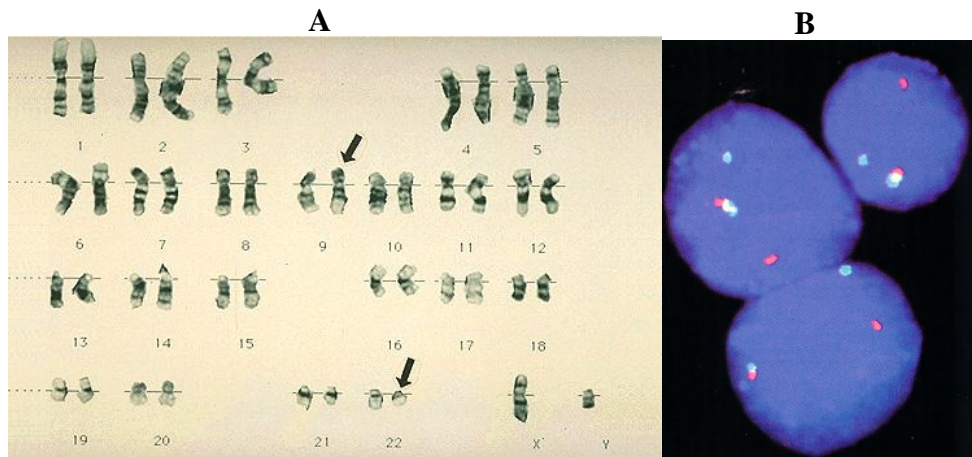


Figura 13. Identificação da cromossomo de Filadélfia por citogenética convencional (A) e por FISH (B).

Ambas as técnicas fornecem informação clínica importante, mas a sua aplicação está restrita a laboratórios especializados, pois necessitam de equipamentos e técnicos especializados. Visto que a maioria dos doentes com quadro de neutrofilia e/ou trombocitose não tem LMC, torna-se óbvia a necessidade de um teste de rastreio, simples e rápido, que permitirá um diagnóstico e uma intervenção terapêutica mais precoce. Nos últimos anos alguns laboratórios têm-se dedicado à elaboração de um teste rápido (*BCR-ABL1 Protein kit*®), que detecte a presença das variantes de proteínas BCR-ABL1 mais frequentes, incluindo a p190, a p210 e a p230 (Lucas C *et al.*, 2011). O ensaio é baseado na imunoprecipitação da proteína BCR-ABL1, através da utilização de pérolas revestidas com anticorpo anti-BCR, e detecção da proteína de fusão com um anticorpo anti-ABL por citometria de fluxo. Este teste mostra que é possível a quantificação desta proteína no plasma e pode ser útil na avaliação da “carga” tumoral. A sensibilidade deste ensaio imunológico é comparável com a dos ensaios por qRT-PCR (Jilani I *et al.*, 2008).

7. EVOLUÇÃO DA DOENÇA

7.1. História natural

A história natural da LMC, estabelecida há mais de 75 anos, sugere uma sobrevivência média, após diagnóstico, de 3 anos. Sem tratamento, a doença evolui de uma fase crónica (FC) para uma fase acelerada (FA) e, eventualmente, termina em crise blástica (CB). Cerca de 25% dos doentes passam directamente de uma FC para CB (Bhatia e Radich 2009).

Na Figura 14 está representado a hematopoiese normal a partir de uma célula estaminal hematopoiética e as alterações que ocorrem na LMC na fase crónica e crise blástica.

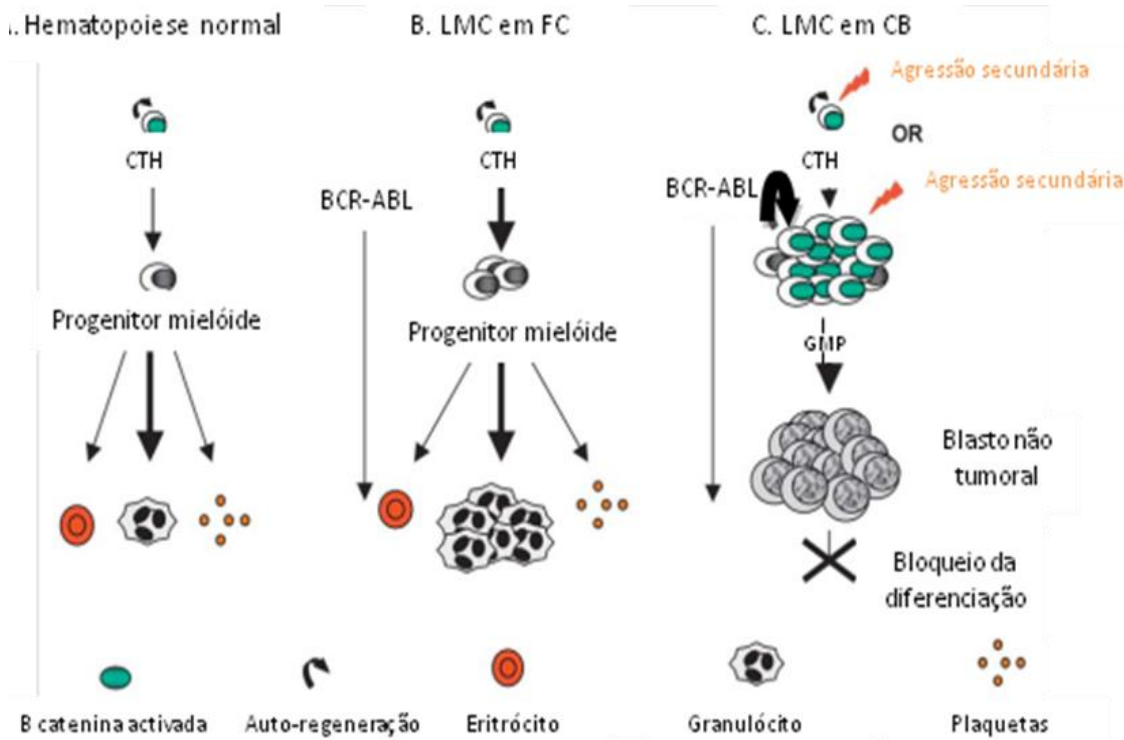


Figura 14. Comparação da hematopoiese normal e na fase crónica e crise blástica da LMC. Em (A) observa-se a hematopoiese normal, onde a célula tronco ou estaminal hematopoiética (CTH) origina um progenitor mielóide que vai originar células maduras da linhagem mielóide, eritrócitos, granulócitos e plaquetas. Apenas a CTH possui β-catenina activada e capacidade de auto-regeneração. Em (B) está representado a hematopoiese na fase

crónica (FC) da LMC. Neste caso, a presença do gene de fusão *BCR-ABL* na população de células progenitoras mielóides conduz à activação de várias vias de sinalização que originam a expansão deste compartimento e subsequente aumento de neutrófilos no sangue periférico. Em (C) observa-se que na crise blástica (CB) a ocorrência de uma segunda mutação pode levar à aquisição de propriedades de auto-regeneração pelo compartimento granulócito-macrófago (GMP), presumivelmente dependente de activação pela β -catenina. Esta mutação poderá ocorrer no compartimento de CTH ou de progenitoras de GMP. Contrariamente à FC, o gene *BCR-ABL* parece contribuir para a capacidade de auto-regeneração deste compartimento e, em cooperação com a β catenina activada e possivelmente outras mutações, bloqueiam a diferenciação e levam ao desenvolvimento de leucemia aguda (*Adaptado de Huntly e Gilliland 2004*).

Na FC o compartimento mielóide encontra-se expandido, mas as células conservam o funcionamento normal mantendo a sua capacidade de diferenciação (Huntly e Gilliland, 2004). Esta é uma fase caracterizada por esplenomegália, anemia e leucocitose ($12 \text{ a } 1000 \times 10^9$) devida ao aumento de neutrófilos em diferentes fases de maturação com predomínio de mielócitos e neutrófilos segmentados (Figura 15). A displasia não é significativa e a percentagem de blastos é inferior a 2% (Swerdlow S *et al.*, 2008), no entanto se esta for superior a 12% sugere que o doente possa estar em transformação para FA ou esta fase encontrar-se já estabelecida (Hoffbrand A *et al.*, 2008). Basofilia é uma alteração constante, eosinofilia é comum e monocitose pode estar presente. Pode observar-se aumento do número de plaquetas mas trombocitopenia é rara. A MO é hipercelular, devido a proliferação granulocítica com um padrão de maturação semelhante ao Sp, a percentagem de blastos é inferior a 5% e, pode existir fibrose moderada em 30% dos casos. Os precursores eritróides e megacariocíticos têm dimensões inferiores ao normal (Swerdlow S *et al.*, 2008) e no Sp podem estar presentes glóbulos vermelhos nucleados (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

É importante a detecção precoce da evolução da doença mas, os limites clínicos e morfológicos entre as diferentes fases são ténues. Os parâmetros usados para as

identificar variam entre diferentes autores e apenas são aplicáveis a doentes tratados com inibidores da tirosina cinase. Na Tabela 5 estão definidos os critérios da OMS para fase acelerada e crise blástica da LMC (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

Quando o doente desenvolve um quadro febril com suores nocturnos, perda ponderal e dor óssea, este é um sinal que a FA pode já estar estabelecida. O quadro hematológico nesta fase é bastante variável mas pode ser muito semelhante ao observado na FC com um claro aumento do número de blastos. A microscopia medular já não é consistente com a FC pois observa-se aumento de células blásticas, promielócitos e fibrose acentuada (Hoffbrand A *et al.*, 2008).

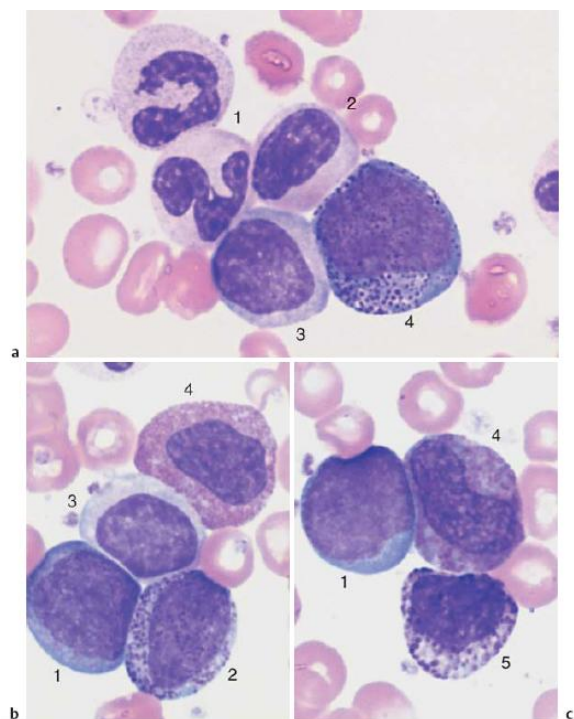


Figura 15. Esfregaços de sangue periférico de um doente com Leucemia Mielóide Crónica em fase crónica. Em **a** são visíveis granulócitos neutrófilos segmentado (1), granulócitos em banda (2) (semelhante a um metamielócito após girar e dobar o núcleo), mielócito com granulação anormal (3) e pró-mielócitos (4). Em **b** e **c** observa-se um mieloblasto (1), pró-mielócito (2), mielócito com granulação anormal (3), eosinófilo imaturo (4) e basófilo (5) (os grânulos têm maiores dimensões e são mais escuros, a cromatina nuclear é mais densa que no pró-mielócito) (Adaptado de Thelml H *et al.*, 2004).

A CB é caracterizada pela perda da capacidade de diferenciação e ausência de resposta à terapêutica (Huntly B *et al.*, 2004). É definida pela presença de mais de 20% (Hoffman R *et al.*, 2009) ou 30% (Hoffbrand V *et al.*, 2008) de blastos na MO ou no Sp (Figura 16), por volumosos aglomerados de blastos na biópsia medular ou desenvolvimento de infiltrados blásticos em localizações extra-medulares como a pele, gânglios linfáticos, baço, tecido ósseo e SNC (Swerdlow S *et al.*, 2008). Em aproximadamente dois terços dos doentes, os blastos apresentam um fenótipo mielóide indiferenciado e o restante terço aparenta ter um fenótipo linfóide. A realização da análise imunofenotípica é essencial para caracterizar a natureza dos blastos (Hoffman R *et al.*, 2009). Se na biópsia medular os agregados de blastos ocuparem uma área significativa, o diagnóstico de CB é justificável (Swerdlow S *et al.*, 2008).

Tabela 5. Critérios da OMS para Fase acelerada e Crise blástica da LMC

Fase Acelerada	<p>O diagnóstico é estabelecido se um ou mais critérios estiverem presente:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 10 a 19% de blastos nos leucócitos do sangue periférico ou das células da MO – Mínimo de 20% de basófilos no sangue periférico – Trombocitopenia persistente ($< 100 \times 10^9/L$) não relacionada com a terapêutica ou trombocitose persistente ($> 100 \times 10^9/L$) que não responde ao tratamento – Esplenomegália e leucocitose que não responde ao tratamento – Evidência citogenética de evolução clonal – Proliferação megacariocítica com extensão considerável e em aglomerados, associadas a marcada fibrose de reticulina ou colagénio e/ou displasia granulocítica severa, devem ser consideradas sugestivas de FA
Crise Blástica	<p>O diagnóstico é estabelecido se um ou mais critérios estiverem presentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> – $\geq 20\%$ de blastos no sangue periférico ou MO – Proliferação blástica extra medular – Aglomerados de blastos, com grandes dimensões, na biopsia de MO.

(Adaptado de Hoffman R *et al.*, 2009)

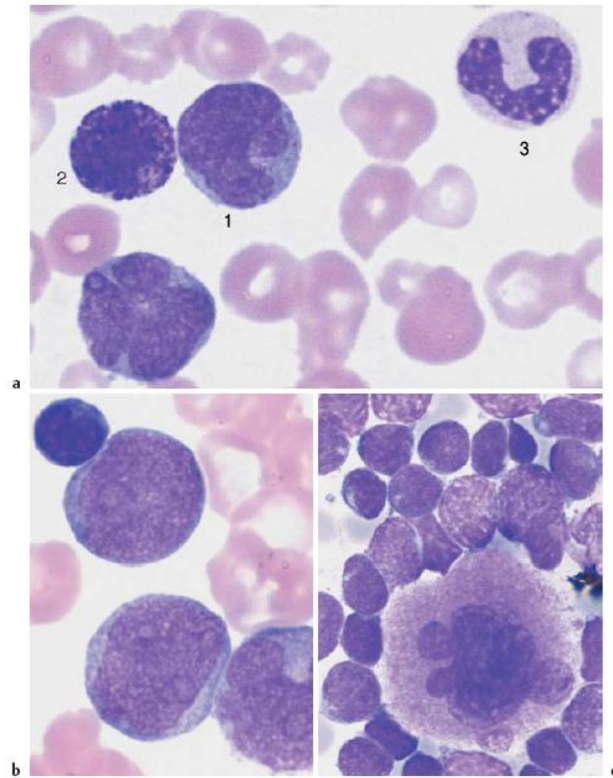


Figura 16. Esfregaço de sangue periférico de um doente com Leucemia Mielóide Crônica em crise blástica. Em **a** são visíveis mieloblastos (1) com lobos nucleares atípicos, granulócitos basófilos (2), granulócitos em banda (3) e trombocitopenia. A proliferação de granulócitos basófilos pode preceder a CB. Em **b** observam-se mieloblastos e em **c** blastos de tamanho variável em torno de um megacariócito hiperlobulado (*Adaptado de Theml H et al., 2004*).

7.2 . Prognóstico

Antes da existência de qualquer terapêutica eficaz o tempo médio de sobrevivência variava entre 2 a 3 anos. Com o aparecimento da quimioterapia convencional a sobrevivência média subiu para 4 anos, mas a evolução para FA e CB foi, apenas, ligeiramente retardada com uma sobrevivência total a rondar os 10 anos. As terapêuticas biológicas, como o IFN- α retardaram a progressão da doença, passando os doentes a viver, em média, 6 anos após o diagnóstico. Com o transplante de MO, 10 a

70% dos doentes atingem uma sobrevivência total de 10 anos, dependendo da fase da doença, idade do doente e o tipo de dador. (Swerdlow S *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidos vários modelos de avaliação prognóstica que identificam diferentes grupos de risco na LMC. Os sistemas globalmente usados na LMC são os índices de Sokal e Hasford (Brecia M *et al.*, 2011).

O índice de Sokal utiliza a percentagem de blastos circulantes, o tamanho do baço (cm), a contagem de plaquetas, a idade, o sexo e a evolução clonal citogenética como os indicadores de prognóstico mais importantes (Tabela 6). Esta escala era baseada nas terapêuticas disponíveis na altura (bussulfano e esplenectomia) e classifica os doentes tratados com quimioterapia convencional em 3 grupos de risco distintos (baixo, médio e alto risco), de acordo com diferentes padrões de sobrevivência. (Longo D *et al.*, 2008).

Tabela 6. Índice de Sokal para avaliação prognóstica na Leucemia Mielóide Crônica.

Parâmetro		Pontuação
Sexo	Masculino	1
	Feminino	2
Plaquetas × 10 ⁹ /L		Plaquetas/1000
Contagem de plaquetas. Fórmula: Risco relativo. $=(0.0255 \times \text{tamanho do baço em cm} - 8.14) + (0.0324 \times \% \text{ blastos} - 2.22) + 0.1025 \times [(\text{plaquetas}/700)^2 - 0.627] - (0.0173 \times ((\text{hematocrito}) - 34.2)) - (0.2682 \times ((\text{pontuação sexo}) - 1.4)].$		
Risco relativo	Grupo de risco	Sobrevida mediana(meses)
< 0.8	Baixo	67
0.8 – 1.2	Intermédio	52
> 1.2	Alto	35

(Adaptado de Hoffbrand, A *et al.*, 2008; Castellano P G *et al.*, 2003)

O sistema de Hasford foi desenvolvido com base em doentes tratados com IFN α e utiliza como indicadores de prognóstico mais importantes a percentagem de blastos circulantes, tamanho do baço, contagem de plaquetas, idade, bem como percentagem de eosinófilos e basófilos (Tabela 7). Este sistema difere do índice de Sokal por ignorar a evolução clonal e incorporar a percentagem de eosinófilos e basófilos. Quando os dois sistemas são comparados, verifica-se que o sistema de Hasford é melhor para predizer o tempo de sobrevivência e identificar maior número de doentes de baixo risco do que o índice de Sokal (Longo D *et al.*, 2008).

Tabela 7. Índice de Hasford para avaliação prognóstica na Leucemia Mielóide Crônica.

Factor de Prognóstico		Valor	
Idade	< 50	0	
	≥ 50	1	
Baço	Extensão máximo por baixo do rebordo costal	Cm	
Blastos	% Sp	0 – 100	
Eosinófilo	% Sp	0 – 100	
Basófilo	< 3% no Sp	0	
	> 3% no Sp	1	
Plaquetas	< $1.500 \times 10^9/L$	0	
	> $1.500 \times 10^9/L$	1	
Fórmula:			
$= 1000 \times (0.6666 \times \text{idade}) + (0.0420 \times \text{tamanho do baço}) + (0.0584 \times \% \text{ blastos}) +$ $(0.0413 \times \% \text{ eosinófilos}) + (0.2039 \times \% \text{ basófilos}) + (1.0956 \times \text{plaquetas})$			
Grupos de risco (pontos)	%	Sobrevivência mediana (m)	Sobrevivência em anos (%)
Baixo (≤ 780)	41	98	76
Intermédio (781 – 1480)	45	65	55
Alto (> 1480)	15	42	25
$p \leq 0,001$			

(Adaptado de Castellano P G *et al.*, 2003)

Ambos os *scores* são ainda hoje altamente reprodutíveis e aceites como modelos prognósticos para doentes em FC (Tabela 8).

Tabela 8. Score de risco na Leucemia Mielóide Crónica

Risco	Sokal	Sobrevivência mediana (m)	Hasford	Sobrevivência mediana (m)
Alto	< 0.8	60	≤780	98
Intermédio	0.8 – 1.2	30	781 – 1480	65
Baixo	> 1.2	24	> 1480	42

(Adaptado de Bollmann PW et al., 2011)

Latagliata *et al.* (2005) publicaram dados que provam que a idade avançada não deve ser considerada com indicador de mau prognóstico, pois os idosos tratados com Imatinib apresentam respostas terapêuticas semelhantes aos dos doentes mais novos. Mais do que a idade o estado geral e a resposta citogenética às terapêuticas anteriores devem ser tidas em conta como factores de prognóstico (Brady S, 2011).

As limitações dos modelos de prognósticos tradicionais incentivaram a procura de novos parâmetros mais adequados às terapêuticas baseadas no uso de inibidores de tirosina cinase. A concentração inibitória específica *in vitro* pré-imatinib (IC₅₀) mostrou ser um factor preditivo da resposta molecular: os doentes com um valor de IC₅₀ baixo atingiam melhor resposta. Estudos subsequentes mostraram que a actividade do transportador orgânico de catiões humano, OCT-1, também influencia a variabilidade inter-doente. Assim, na presença de elevada actividade de OCT-1, as respostas com a dose *standard* ou elevada de Imatinib são semelhantes. Já a actividade baixa está associada com uma resposta molecular diminuída, no entanto este efeito negativo pode ser ultrapassado com o aumento da dose de Imatinib (Breccia e Alimena, 2011).

Recentemente foi publicado o índice de Eutos que foi criado para ser aplicado em doentes tratados com inibidores de tirosina cinase. Neste índice apenas a percentagem de basófilos e o tamanho do baço foram demonstrados como factores discriminadores entre doentes de baixo e alto risco. Este sistema simples foi descrito como superior ao índice de Sokal em termos de eficácia em doentes tratados com Imatinib, tendo sido capaz de identificar os indivíduos com risco aumentado de progressão da doença e de menor sobrevivência. No entanto, continua sem ser validado para doentes tratados com inibidores da tirosina cinase de segunda geração (Brecia e Alimena, 2011).

8. TRATAMENTO

8.1. Definição de resposta ao tratamento

Para uma melhor compreensão do tratamento da LMC é necessário definir o tipo de resposta que podemos obter com os agentes terapêuticos utilizados. A resposta ao tratamento pode ser avaliada a nível hematológico e citogenético/molecular. A resposta hematológica é quantificada através da observação microscópica de um esfregaço de Sp e da contagem do número de células brancas, vermelhas e plaquetas presentes na amostra. A análise citogenética utiliza uma amostra de Sp ou de MO, e avalia se há persistência do cromossoma Ph nas células observadas, enquanto a molecular avalia o número de cópias do gene/transcrito (ARNm) de *BCR/ABL*.

Resposta hematológica completa (RHC) é definida como a obtenção de uma contagem diferencial de leucócitos e plaquetas normal e o desaparecimento de todos os sinais e sintomas da LMC. Entende-se por resposta hematológica parcial (RHP) a diminuição do número de leucócitos para valores inferiores a 50% do valor pré-

tratamento ou a normalização dos valores acompanhada de esplenomegália persistente ou pela presença de células imaturas no esfregaço de Sp. A resposta citogenética completa (RCyC) é definida pela ausência de metáfases Ph-positivas nas células medulares, e a resposta citogenética parcial (RCyP) como a presença de 1 a 95% de metáfases Ph-positivas. A redução de 3-log ou mais de mRNA *BCR-ABL*, comparativamente ao valor *standard*, foi designada de resposta molecular *major* (RMM), enquanto a ausência de detecção de mRNA *BCR-ABL* de forma consistente é entendida como uma resposta molecular completa (RMC) (Bhatia e Radich, 2009).

Tabela 9. Monitorização e definição da resposta ao tratamento

Resposta hematológica	Resposta citogenética	Resposta molecular
<p>Completa:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Plaquetas < $450 \times 10^9/L$; – Leucócitos < $10 \times 10^9/L$; sangue periférico sem granulócitos e menos de 5% de basófilos; – Sem esplenomegália. <p>Parcial:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Número de leucócitos > 50% do valor inicial ou com valor normal; – Esplenomegália persistente; – Presença de células imaturas no sangue periférico. 	<p>Completa: Ph-negativas = 0%;</p> <p>Major: Ph-positivas = 1 a 35%;</p> <p>Minor: Ph-positivas = 36 a 65%;</p> <p>Mínima: Ph-positivas = 66 a 95%;</p> <p>Ausência: Ph-positivas < 95%.</p>	<p>Completa: mRNA <i>BCR-ABL</i> não quantificável e não detectável;</p> <p>Major: mRNA <i>BCR-ABL</i> \leq 0.10%.</p>

(Adaptado de Bhatia e Radich 2009)

O tratamento da LMC está em constante mudança e a selecção deste deve ter em conta a experiência do clínico e a preferência do doente. Uma discussão da terapêutica, com enfoque nos resultados, riscos e efeitos tóxicos das diferentes abordagens, é aconselhada. O tratamento tem como objectivo a remissão molecular completa e a cura,

nesse sentido tentamos alcançar a erradicação de qualquer célula residual que contenha o transcrito *BCR-ABL* (Longo D *et al.*, 2008).

Ao longo dos anos a terapêutica da LMC sofreu diversas alterações e adaptações, mas os maiores avanços nesta área só se verificaram durante a década de 80 do século XX. Inicialmente esta patologia era tratada com arsénico e radioterapia, que apenas exerciam um certo controlo sobre os sintomas. Durante a década de 50, o tratamento de escolha era o bussulfano, e os doentes tratados com este fármaco apresentavam melhoria na qualidade de vida, embora sem impacto na sobrevivência global destes, tendo sido substituído, mais tarde, pela hidroxycarbamida. No entanto só com a introdução do IFN α é que foi atingida a remissão citogenética, tendo sido o tratamento de escolha para doentes com critérios de exclusão para transplante alogénico de células estaminais (TCE). Actualmente, o tratamento de primeira linha da LMC é com inibidores da tirosina cinase, tendo sido o Imatinib o primeiro a chegar ao mercado (Aranha FJP, 2008).

8.2. Quimioterapia

Os primeiros fármacos anticancerígenos foram introduzidos na prática clínica na década de 50 (século XX) e, actualmente, estão reservados para a rápida diminuição da leucocitose, redução dos sintomas e reversão de esplenomegália sintomática (Longo D *et al.*, 2008). O bussulfano (BU), um agente alquilante que actua nas células progenitoras primitivas, era administrado nas doses de 4 a 6 mg/dia, até o número de leucócitos ser inferior a $30 \times 10^9/L$. O seu efeito é prolongado e a contagem leucocitária pode ainda diminuir, após a terapia ser descontinuada (Hoffman R *et al.*, 2009). Deste modo, é de extrema importância reduzir substancialmente a dose, ou interromper a

terapêutica antes que o número de leucócitos seja inferior a $20 \times 10^9/L$, para evitar leucopenia grave e prolongada (Hoffbrand V *et al.*, 2008). O seu uso não é recomendado devido aos efeitos colaterais severos que o doente pode desenvolver como mielossupressão súbita (em 5 a 10% dos doentes), fibrose pulmonar, endocárdica e medular, e síndrome semelhante à doença de Addison (Longo D *et al.*, 2008).

Como alternativa ao BU surge a hidroxiuréia (HU), um inibidor da ribonucleotídeo redutase que induz um rápido controlo da doença. A dose inicial é de 1 a 4g/dia, devendo ser reduzida para metade a cada 50% de diminuição do número de células brancas (Longo D *et al.*, 2008). Este é um fármaco que apresenta menor toxicidade que o BU, tendo como efeitos secundários principais os distúrbios gastro-intestinais, úlceras na mucosa oral, erupções cutâneas e mielossupressão reversível. Em estudos randomizados, mostrou prolongar a sobrevivência dos doentes com LMC quando comparada com o tratamento com BU (Bhatia e Radich, 2009).

8.3. Interferão α

O interferão α é um fármaco que pertence a uma família de glicoproteínas naturais com propriedades antivirais e antiproliferativas (Goldman J, 2008). Os mecanismos de acção do IFN α ainda não são totalmente compreendidos, mas podem incluir a inibição da proliferação exagerada, correcção do defeito de adesão do clone maligno da LMC ou a estimulação de uma resposta imune contra a LMC (Bhatia e Radich, 2009). Era usado após o controlo da contagem de leucócitos com hidroxycarbamida, numa dose de 3 a 9 megaunidades, entre 3 a 7 vezes por semana, administrada por via subcutânea (Hoffbrand V *et al.*, 2004), 3 a 5 megaunidades/m² diariamente (Hoffbrand, AV *et al.*, 2008) ou 4 a 5 megaunidades/ m²/dia (Bhatia e

Radich, 2009). A maioria dos doentes desenvolve, durante os primeiros dias de tratamento, um quadro gripal-*like*, que responde ao paracetamol e regride gradualmente (Hoffbrand V *et al.*, 2004). A toxicidade é mais frequente em doentes idosos e geralmente é ligeira e reversível, tendo como efeitos secundários mais graves letargia, mal-estar, anorexia, perda ponderal, depressão e síndromes autoimunes, como tirotoxicose. As remissões mantidas são comuns em doentes mais jovens, com início da terapêutica logo após o diagnóstico, com doença pouco avançada e com um estágio de prognóstico favorável. A remissão hematológica verifica-se cerca de 1 a 3 mês após iniciar terapêutica, e a remissão citogenética pode ser observada, em média, 9 a 18 meses e manter-se até 10 anos (Hoffbrand V *et al.*, 2008).

Ao longo dos anos vários estudos randomizados, que comparam a eficácia do tratamento com IFN α com as terapias usadas anteriormente, foram realizados e mostraram um aumento das taxas de sobrevivência em doentes tratados com IFN α . Um estudo multicêntrico Francês demonstrou, vantagem terapêutica na combinação de IFN com *cytosine arabinoside*. Estudos controlados sugerem que o IFN aumenta a esperança de vida, aproximadamente em 20 meses, quando comparado com o BU e a HU (Hoffbrand V *et al.*, 2008). Mas, como já foi referenciado anteriormente, o uso do IFN no tratamento da LMC tem vindo a ser substituído pelo Imatinib e por outros inibidores de tirosina cinase.

8.4. Transplante de medula óssea

Até ao fim dos anos 90 do século passado, o TCE alogénico era a terapêutica de primeira linha para doentes jovens (idade inferior a 50 anos) com LMC, em FC e com dador HLA totalmente compatível. Tinha como meta a cura da LMC, ou seja a remissão

molecular da doença. Entre 1980 e 2003 foram realizados 13.416 TCE alogénicos em doentes com LMC, com uma mediana de idades de 36 anos, sendo que a maioria (60%) era do sexo masculino. Antes da introdução do Imatinib, 60% das indicações para TCE alogénico era a LMC em FC, tendo actualmente diminuído para 20%. No entanto houve um aumento de 16% nos TCE alogénicos realizados em indivíduos com LMC em FA (Aranha FJP, 2008). Este é considerado o “único” tratamento curativo existente para a LMC, no entanto, dados obtidos recentemente, de doentes tratados desta forma, mostraram que pode ocorrer recidiva tardia até 15 anos após o transplante. Uma relação desequilibrada entre as células leucémicas e a doença enxerto *versus* hospedeiro (DEVH), podem estar na base destas recaídas tardias (Chomel e Turhan, 2011).

Nos dias de hoje, as indicações para a realização de TCE alogénico como primeira abordagem ao tratamento da LMC estão restritas ao grupo pediátrico (Lee ML, 2008) e a casos em que o uso de Imatinib não é possível, tanto por falta de acesso à medicação ou por problemas económicos. Como conduta, deve-se procurar sempre um dador HLA relacionado totalmente compatível (Aranha FJP, 2008). Doentes que não atingem uma RHC nos primeiros 6 meses de tratamento devem ser alvo de estudo citogenético para detectar a presença de mutações e ser colocada a hipótese de realização de TCH alogénico, tanto com dador relacionado como não relacionado. Ausência de RCyC aos 18 meses de tratamento, também é indicação para realização de estudo citogenético de mutações resistentes ao Imatinib e a inibidores de tirosina cinase de 2ª geração, caso uma mutação esteja presente e o doente tenha um dador HLA compatível, o TCH alogénico está indicado. A perda de RHC, RCyC ou RMM em doentes com mutação T315I ou da região P-loop, com doador HLA compatível, relacionado ou não, o TCE alogénico está indicado. Por fim, a progressão para FA ou CB são duas situações que são incuráveis sem TCE alogénico (Aranha FJP, 2008), por

outro lado, os resultados obtidos são piores em consequência do aumento da mortalidade relacionada com o transplante e da recidiva, que pode ser superior a 50% (Vigorito AC, 2008).

Antes de ser tomada a decisão para a realização do TCE alogénico existem factores, que influenciam de forma significativa o resultado do tratamento, que devem ser considerados: o doente (idade e fase da doença), o tipo de dador (singénico, alogénico HLA compatível, relacionado ou não), o esquema preparatório (mieloablativos), a DEVH e o tratamento pós-transplante (Longo D *et al.*, 2008).

A figura 17 representa um esquema realizado pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), para seguimento e monitorização dos doentes no período pós-transplante.

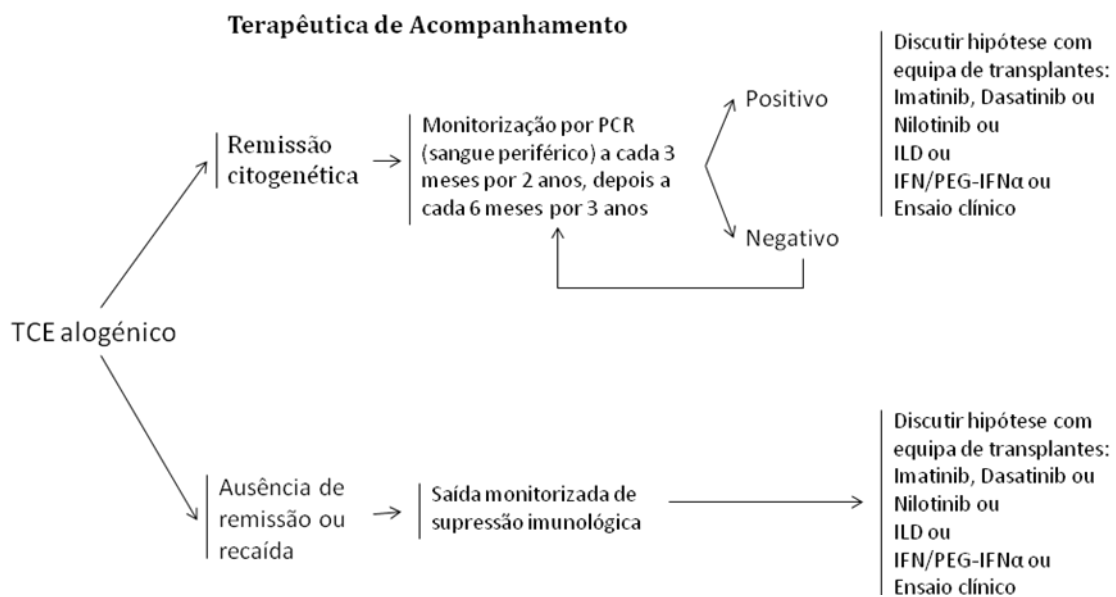


Figura 17. Fluxograma de acompanhamento pós transplante alogénico de células estaminais de doentes com LMC. ILD: Infusão de linfócitos de doador, PEG-IFN α : Interferão α pegulado. (Adaptado de O'Brien S *et al.*, 2010).

8.5. Novos fármacos dirigidos a alvos moleculares – Os inibidores de tirosina cinases

O avanço no conhecimento sobre a patogénese molecular das NMPs, permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos dirigidas a alvos moleculares, particularmente os inibidores da transdução de sinal dirigidos a proteínas tirosina cinase específicas com relevância no tratamento destas doenças (Cortes e Kantarjian, 2004).

O primeiro inibidor de tirosina cinase aprovado pela FDA foi o Imatinib (Huntly e Gilliland, 2004; Druker B, 2008). Inicialmente este fármaco foi encarado com algum cepticismo pela comunidade científica, devido ao facto dos inibidores da ligação de ATP não possuírem especificidade alvo suficiente para serem clinicamente úteis (Druker B, 2008). No entanto, com o avançar dos ensaios clínicos e com a experiência clínica adquirida ao longo dos últimos anos, este fármaco revolucionou os princípios de tratamento da LMC, relegando para segundo plano as terapêuticas usadas anteriormente (Radich J, 2011).

Este fármaco actua por inibição competitiva no local de ligação ao ATP da ABL cinase na conformação inactiva (Figura 18), o que inibe a fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas envolvidas na transdução de sinal mediada pela proteína BCR-ABL (Longo D *et al.*, 2008). O Imatinib exibe um efeito inibidor, com alto grau de especificidade sobre três tirosinas cinases: ABL (BCR-ABL, v-ABL, c-ABL), PDGFR (factor de crescimento derivado de plaquetas) e c-KIT. Por este motivo, apresenta actividade anti-proliferativa em linhas celulares que expressam a proteína ABL activada e induz a morte celular por apoptose (Alves R, 2009).

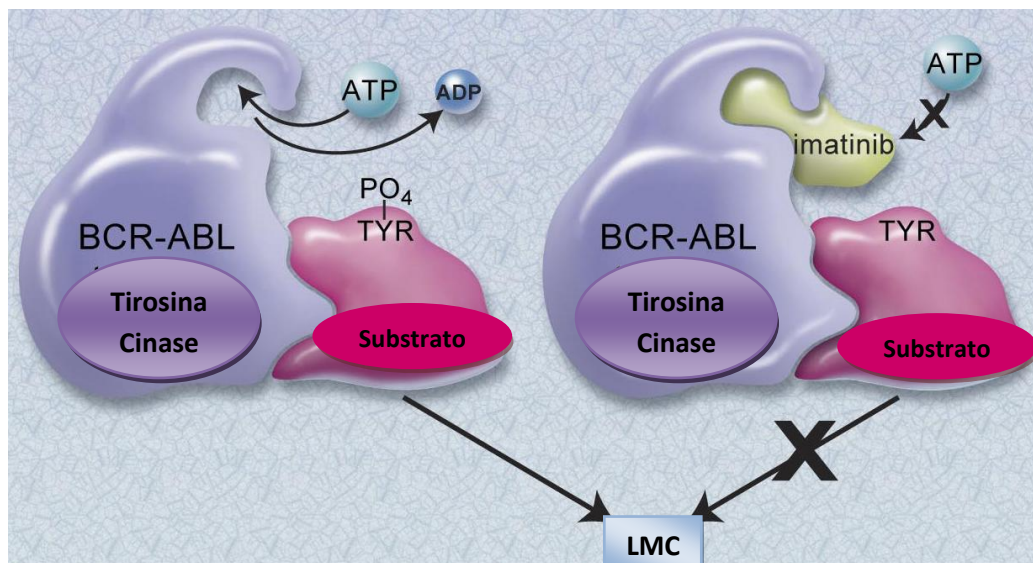


Figura 18. Mecanismo de acção do Imatinib. Em A o BCR-ABL constitutivamente activo funciona transferindo fosfatos do ATP para os resíduos de tirosina em vários substratos causando proliferação exagerada das células mielóides características da LMC. Em B o Imatinib bloqueia a ligação do ATP à tirosina cinase do BCR-ABL, inibindo a sua actividade cinase (Adaptado de Druker B, 2008).

Na LMC recém-diagnosticada, o Imatinib usado em monoterapia diária na dose standart de 400mg (Deininger M *et al.*, 2005) é mais eficaz que as terapêuticas referidas anteriormente. A sua efectividade no tratamento das NMPs já foi comprovada, nomeadamente no tratamento da LMC, induzindo remissão hematológica completa aos 18 meses em 90% (Klener P, 2006), 98,6% (Alves R, 2009) e 97% dos casos (Longo D *et al.*, 2008). De igual modo, a taxa de remissão citogenética completa foi de 60 a 70% (Klener P, 2006), 55,7% (Alves R, 2009) e 76% dos doentes (Longo D *et al.*, 2008). De todos os indivíduos tratados com Imatinib, 26% (Longo D *et al.*, 2008) e 67,6% (Alves 2009) atingiram a remissão molecular *major*, estando livres de progressão da doença aos 5 anos. Doentes em FC que não atingiram qualquer remissão citogenética após 6 meses de tratamento provavelmente não atingiram a remissão molecular *major*, devendo propor-se outras abordagens de tratamento (Longo D *et al.*, 2008).

O Imatinib deve ser administrado por via oral. Os efeitos secundários são, geralmente, moderados e incluem náuseas, diarreia, edema periorbital e erupção cutânea. A mielosupressão é frequente, provavelmente reflectindo a eficácia da supressão da hematopoiese Ph-positiva e não a toxicidade do fármaco (Deininger M *et al.*, 2005). O tratamento das reacções adversas é geralmente sintomático (Longo D *et al.*, 2008). Visto ser um fármaco com metabolização hepática pelo sistema do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP3A5), a sua concentração plasmática pode ser afectada pela co-administração de alguns medicamentos. A dexametasona, carbamazepina, fenobarbital e fenitoína são indutores do sistema P450 e diminuem o nível plasmático de Imatinib. Já a eritromicina, azitromicina, cetoconazol, amiodarona e fluoxetina são inibidores e, portanto, aumentam o nível plasmático deste inibidor de tirosina cinase (Pagnano K, 2008).

Apesar dos excelentes resultados obtidos com esta terapêutica, cerca de 15% dos indivíduos vão apresentar alguma forma de resistência ao tratamento (Chomel e Turhan, 2011). Esta é documentada em todas as fases da doença, principalmente na FA e CB (Alves R, 2009). A resistência pode ser considerada primária se o doente nunca apresentou resposta ao tratamento e secundária quando ocorre perda da resposta adquirida. Pode ser classificada como hematológica, citogenética e molecular (Pagnano K, 2008). Os mecanismos de resistência ainda não são totalmente conhecidos e são muitas vezes multifactoriais, tornando difícil o controlo clínico. Estes podem ser classificados com dependentes do Imatinib, *BCR-ABL* dependentes ou *BCR-ABL* independentes (ver tabela 10).

Tabela 10. Mecanismos de resistência da LMC ao Imatinib

<p>Dependentes do Imatinib (diminuição da concentração intracelular)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aumento do efluxo do fármaco (sobre-expressão dos transportadores ABCB1 e ABCG2) 2. Diminuição do influxo do fármaco (sub-expressão do transportador OCT1) 3. Sequestro plasmático do Imatinib
<p>BCR-ABL dependentes</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Amplificação do gene <i>BCR-ABL</i> 2. Mutação <i>missense</i> do domínio cinase BCR-ABL
<p>BCR-ABL independentes</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Instabilidade genética 2. Quiescência da célula estaminal leucémica 3. Contribuição do nicho de células estaminais leucémicas 4. Vias de sinalização alternativas

(Adaptado de Chomel e Turhan, 2011)

Com a possibilidade de desenvolvimento de resistência tornou-se evidente a necessidade de identificar factores que possam ser associados com a maior probabilidade de falência do tratamento. Foram identificados como factores de risco para o desenvolvimento de resistência na fase crónica a existência de um número de plaquetas superior a 450.000/mm³ no hematócrito pré-imatinib, ou para um número inferior a 50.000/mm³ durante o tratamento (Alves R, 2009). O sexo feminino, o índice de Sokal elevado e a terapêutica de curta duração são, também factores associados com maior risco de recorrência (Eiring A *et al.*, 2011).

A existência de resistência ao Imatinib devido a mutações no domínio cinase levou ao desenvolvimento de novos inibidores de tirosina cinase (2^a geração) com uma conformação diferente, como por exemplo o Nilotinib e o Dasatinib. O Nilotinib é um inibidor ATP-competitivo da actividade da proteína tirosina cinase BCR-ABL, prevenindo a activação das vias mitogénicas e antiapoptóticas dependentes do *BCR-*

ABL, induzindo a morte das células que expressam este fenótipo. Estudos pré-clínicos demonstraram que este atinge concentrações intracelulares mais elevadas que os seus análogos de primeira geração, induzindo a apoptose celular em concentrações inferiores (Delamain e Conchon, 2008). O Dasatinib é um inibidor da cinase BCR-ABL e SRC (sarcoma), sendo utilizado no tratamento de doentes com LMC resistentes ou intolerantes à terapêutica de primeira linha. Inibe a actividade da cinase BCR-ABL em baixas concentrações (nanomolar) e em todas as formas resistentes ao Imatinib clinicamente relevantes (Okabe S *et al.*, 2008). Ambos são agentes administrados por via oral duas vezes por dia, exibindo perfis de toxicidade semelhantes ao Imatinib, embora com algumas diferenças significativas. Por exemplo, foram observados casos de derrame pleural em doentes tratados com Dasatinib e elevação das enzimas hepáticas e prolongamento do intervalo QT em alguns doentes tratados com Nilotinib (Druker B, 2008).

Apesar dos avanços alcançados nesta área, a mutação T315I é um problema recorrente para todos os inibidores da tirosina cinase conhecidos actualmente. Neste sentido, os fármacos de terceira geração surgem como um potencial resgate para os doentes resistentes aos fármacos usados actualmente (Eiring A *et al.*, 2011). Bosutinib é um novo e activo inibidor da cinase SRC e do complexo *ABL*, sendo muito mais activo *in vitro* que o Imatinib e em algumas das mutações testadas (Souza C, 2008). No entanto, existem ainda outros fármacos em fase de desenvolvimento e que actuam noutros alvos na via de sinalização activada pela proteína BCR/*ABL*, como inibidores da proteína RAS, e da mTOR (Souza C, 2008).

9. CONCLUSÃO

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma doença clonal que resulta de uma alteração genética da célula estaminal hematopoiética multipotencial. Esta envolve a translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, e origina um cromossoma quimérico designado de cromossoma Filadélfia e um gene de fusão *BCR-ABL* que codifica uma proteína de fusão com actividade de tirosina cinase aumentada. É a neoplasia mieloproliferativa crónica (NMP) mais frequente, representando 3% de todas as neoplasias malignas humanas. Esta caracteriza-se pela expansão da linha mielóide, principalmente à custa do aumento do número de granulócitos imaturos e maduros, no entanto também podem ser observadas alterações no número de eritrócitos e plaquetas.

Esta patologia é mais frequente no sexo masculino e em doentes na quinta e sexta década de vida. O início da doença é insidioso, marcado por sintomas inespecíficos, sendo o diagnóstico por vezes efectuado num hemograma de rotina. Este mostra leucocitose acentuada, e a presença de células mielóides em vários estádios de maturação.

Além dos avanços no diagnóstico, a detecção de anomalias citogenéticas, nomeadamente a presença do gene quimérico *BCR-ABL*, têm dado um contributo precioso na abordagem diagnóstica e permitiu melhorar a terapêutica dos doentes com LMC. De facto, a introdução dos inibidores de tirosina cinase como terapêutica de primeira linha aumentou as respostas terapêuticas e a sobrevivência dos doentes.

Contudo, o desenvolvimento de resistências e o maior conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos tem levado os investigadores à descoberta de

novos fármacos dirigidos a alvos moleculares que permitem novas e mais eficazes abordagens terapêuticas na LMC e, com menor toxicidade.

No entanto, e apesar dos avanços, continuam por responder algumas questões, nomeadamente: Se os transcritos de M-bcr e m-bcr são detectáveis, em baixa frequência, em amostras de Sp de indivíduos saudáveis, porquê é que a doença só se desenvolve numa pequena percentagem de indivíduos? Qual o evento responsável para que a translocação ocorra? Será a presença da t(9;22)(q34;q11.2) suficiente para induzir a doença?

A resposta a estas questões permitirá uma melhor compreensão desta doença e a descoberta de novas abordagens terapêuticas mais eficazes e a possível cura definitiva da doença.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Advani AS, Pendergast AM (2002). **Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects.** *Leukemia Research* 26(8): 713-720.
2. Alves, RCS (2009). **Análise de pacientes com leucemia mieloide crónica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31(3), 166-177.
3. Aranha, FJP (2008). **Leucemia Mielóide Crónica: transplante de medula óssea.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30, 41-46.
4. Aster J, Kumar V (2000). **Leucócitos, Linfonodos, Baço e Timo.** In: Robbins - *Patologia estrutural e funcional* (6ª ed.), pp. 608 - 616. Guanabara Koogan.
5. Breccia M, Alimena G (2011). **Bringing prognostic scores for chronic myeloid leukemia patients up to date.** *Expert Reviews Hematology*, 4(4): 373-375.
6. Bollmann PW (2011). **Leucemia mielóide crónica: passado, presente e futuro.** *Bone*, 9(11): 236-243.
7. Campbell PJ, Green A R (2006). **The myeloproliferative disorders.** *The New England Journal of Medicine*, 355(23), 2452-66.
8. Castellano PG *et al* (2003). **Guía de actuación en LMC.**
9. Chomel JC, Turhan AG (2011). **Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance , persistence and long-term dormancy.** *Oncotarget*, 2(9), 713 - 727.
10. Conduas do INCA (2003). **Leucemia mielóide crónica.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, 49(1): 5-8.

11. Cortes J, Albitar M *et al.* (2003). **Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies.** *Blood*, 101(5): 1692.
12. Dalerba P, Cho RW, *et al.* (2007). **Cancer Stem Cells: Models and Concepts.** *Annual Review of Medicine*, 58(1): 267-284.
13. Deininger M, Goldman JM, Melo JV (2000). **The molecular biology of chronic myeloid leukemia** *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* *Blood*, 96 (10), 3343-3356.
14. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ (2005). **Review in translational hematology** *The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia.* *Blood*, 105(7), 2640-2653.
15. Delhommeau F *et al.* (2006). **Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(24): 2939-2953.
16. Delamain MT, Conchon M (2008). **Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30(19), 37-40.
17. Druker BJ (2008). **Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML.** *Blood*, 112(13), 4808-4817.
18. Eiring AM, Khorashad JS, Morley K, Deininger M (2011). **Advances in the treatment of chronic Myeloid Leukemia.** *BMC medicine*, 9(99), 1-6.
19. Faderl S *et al.* (1999). **The biology of chronic myeloid leukemia.** *New England Journal of Medicine*, 16, 164-172.
20. Fox SI (1996). **Human Physiology.** Wm. C. Brown. Publishers. USA.

21. Haferlach C *et al.* (2008). **Myelodysplastic syndromes with del(5q): indications and strategies for cytogenetic testing**, *Cancer Genet Cytogenet*, 187(2): 101-111.
22. Haferlach T, Bacher U *et al.* (2008). **The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers**. *Ann Hematol*, 87: 1-10.
23. Helmann A (2008). **Myeloproliferative syndromes: diagnosis and therapeutic options**. *Polskie archiwum mudycyny wewnetrznej*. 118: 756-759.
24. Hehlmann RA, Hochhaus *et al.* (2007). **Chronic myeloid leukaemia**. *The Lancet* 370(9584): 342-350.
25. Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham E (2008). **Chronic myeloid leukemia**
In: *Postgraduate Haematology* (5^a ed.), pp603-618. Blackwell Publishing.
26. Hoffbrand AV, Pettit J, Moss P (2008). **Leucemia mielóide crónica**. In:
Fundamentos em Hematologia (5^a ed), pp184-191. Artmed.
27. Hoffman R *et al* (2009) **Chronic Myeloid Leukemia**. In: *Hematology basic principles and practice* (5^a ed.), pp1109-1123. Churchill Livingstone.
28. Huntly B J P, Gilliland DG (2004). **Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia**. *Cancer cell*, 6(3): 199-201.
29. Jilani I *et al* (2008). **An immunological method for the detection of BCR-ABL fusion protein and monitoring its activation**. *Leukemia Research*, 32(6): 936-943.
30. Kaushansky K (2005). **On the Molecular Origins of the Chronic Myeloproliferative Disorders: It All Makes Sense**. *Hematology*, 533-537.

31. Klener P (2006). **Some New Findings on the Pathogenesis of Myeloproliferative Disorders and Possibilities for More Effective Treatment.** *Cancer*, 4: 4-8.
32. Lee MLM (2008). **Leucemia Mielóide Crônica em pediatria: perspectivas actuais.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30: 59-65.
33. Levine RL, Gilliland DG (2008). **Myeloproliferative disorders.** *Hematology*, 112(6), 2190-2198.
34. Lobo NA, Shimono Y *et al.* (2007). **The Biology of Cancer Stem Cells.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1): 675-699.
35. Longo D *et al* (2008). **Chronic myeloid leukemia.** In: Harrison's Principles of Internal Medicine. (17^a ed) pp. McGraw-Hill.
36. Lucas CM *et al* (2011). **Rapid diagnosis of chronic myeloid leukemia by flow cytometric detection of BCR-ABL1 protein.** *Haematologica*, 96(7), 1077-1078.
37. Myatt SS, Lam EW (2007). **Promiscuous and lineage-specific roles of cell cycle regulators in haematopoiesis.** *Cell Division*, 2(1): 6.
38. Mehta AB, Hoffbrand AV (2005). **Chronic myeloid leukemia.** In: *Haematology at a Glance* (2^a ed), pp56-57. Blackwell Science.
39. O'Brian S *et al.* (2010). **Practice Guidelines in Oncology.** *Cancer*.
40. Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K (2008). **Characteristics of dasatinib- and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells.** *Clinical cancer research* 14(19): 6181-6186.
41. Pagnano KBB (2008). **Leucemia Mielóide Crônica: causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe.** *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30: 22-26.

42. Provan D (2003). **Chronic myeloid leukaemia**. In: ABC of clinical haematology (2^a ed.), pp. 19 - 22). BMJ Books.
43. Quintás-Cardama A, Cortes J (2009). **Molecular biology of bcr-abl1 – positive chronic myeloid leukemia**. Hematology, 113(8): 1619-1630.
44. Radich JP (2011). **Measuring Response to BCR - ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia**. Cancer, 00: 1-12,
45. Rohrbacher M (2009). **Epidemiology of chronic myeloid leukemia (CML)**. Best Practice & Research Clinical Haematology, 22: 295-302.
46. Schafer A (2006). **Molecular Basis if the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essencial thrombocythemia**. Blood, 107: 4214-4222.
47. Skoda R (2010). **Biological Basis of myeloproliferative neoplasm**. Hematology Education, 4(1): 183-188.
48. Slater D *et al* (2005). **Importance of molecular confirmation in the diagnosis of myeloproliferative disorders**. Community Oncology, 2(5): 418-422.
49. Souza C (2008). **Leucemia Mielóide Crônica: novas drogas em desenvolvimento**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 30: 32-36.
50. Spivak JL, Silver RT (2008). **The revised World Health Organization diagnostica criteria for polycythemia vera, essencial thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal**. Blood, 112(2): 231-239.
51. Stein B (2011). **Advanced age and prognosis in chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors**. Leukemia Research, 35: 1161-1163.
52. Swerdlow S *et al* (2008) **Introduction and Overview of the classification of the Myeloid Neoplasm**. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4^a ed), pp18-30. International Agency for Research on Cancer.

53. Swerdlow S *et al* (2008) **Myeloproliferative Neoplasms**. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4^a ed), pp18-30. International Agency for Research on Cancer.
54. Tefferi A (2003). **Polycythemia Vera: A Comprehensive Review and Clinical Recommendations**. Mayo Clinic Proceedings, 78: 174-194.
55. Tefferi A, Gilliland DG (2007). **Oncogenes in myeloproliferative disorders**. Cell cycle, 6(5): 550-66.
56. Thelm H *et al* (2004). **Chronic Myeloid Leukemia and Myeloproliferative Syndrome (Chronic Myeloproliferative Disorders, CMPD)**. In: Color Atlas of Hematology (2^a ed), pp114-121. Thieme.
57. Vannuchi A.; Guglielmelli P.; Tefferi A. (2009). **Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasm**. Cancer Journal of clinicians American Cancer Society.
58. Vardiman JW *et al*. (2008). **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes**. Hematology, 114(5): 937-951.
59. Vardiman J, Hyjek E (2008). **World Health Organization Classification , Evaluation , and Genetics of the Myeloproliferative Neoplasm Variants Introduction: WHO classification of MPN variants**. Hematology: 250-256.
60. Vigorito AC (2008). **Influência do imatinibe no resultado do TMO e sua eficácia no tratamento da recaída**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 30: 47-51.
61. Walz C, Sattler M (2006). **Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)**. Critical reviews in oncology/hematology ,57(2): 145-164.

62. Zhou G-B, *et al.* (2007). **Treatment of acute promyelocytic leukaemia with *all-trans* retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 362(1482): 959-971.