

ANÁLISE CITOGENÉTICA NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA CYTOGENETIC ANALYSIS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Vanderléia da S. Montenegro¹, Vera Maria Valporto O. dos Santos², Melissa Veith³

RESUMO

Este artigo visa investigar, através de revisão bibliográfica, a aplicação da análise citogenética clássica e molecular na pesquisa da Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Tais técnicas de análise detectam anormalidades cromossômicas e as relacionam a um melhor ou pior prognóstico para o paciente, com possível evolução para uma fase aguda ou crônica da doença e auxiliam na orientação terapêutica mais adequada. Com base nos erros de divisão celular, pode-se observar a maior frequência de mutação e de aberrações cromossômicas em células afetadas. Os dados citogenéticos envolvidos têm também importância fundamental no mapeamento gênico. O cariótipo final é estabelecido com base em estudos de técnicas em análise citogenética clássica e permite que o profissional avalie o prognóstico e tratamento da doença mediante a presença do marcador da leucemia mielóide crônica, o cromossomo Philadelphia.

Descritores: leucemia mielóide crônica, aberrações cromossômicas, análise citogenética.

ABSTRACT

This article aims to investigate, through literature review, the application of classical cytogenetic and molecular analysis in search Chronic Myelogenous Leukemia (CML). These techniques of analysis detect chromosomal abnormalities and relate to a better or worse prognosis for the patient, with possible changes to a chronic or acute phase of the disease and help guiding the therapy in a more appropriate form. Based on the errors of cell division, one can observe the highest frequency of mutation and chromosomal aberrations in cells affected. Cytogenetic data involved also have fundamental importance in gene mapping. The karyotype final is set based on studies of techniques in classical cytogenetic analysis and allows the professional evaluate the prognosis and treatment of disease through the presence of the marker of chronic myeloid leukemia (CML), the Philadelphia chromosome. Key-words: chronic myeloid leukemia, chromosome aberrations; cytogenetic analysis.

INTRODUÇÃO

A análise citogenética das células malignas representou o início de um dos maiores avanços sobre a natureza biológica das neoplasias, em maior significado no campo da leucemogênese, com sua implicação prognóstica.¹ Em 1902, Theodor Boveri e Walter Sulston² propuseram que os fatores de hereditariedade são partes de cromossomos, de acordo com as leis de Mendel em que o gene passa a ser considerado como a unidade funcional básica da hereditariedade, gerando grande diversidade de experimentos. Os autores reconheceram independentemente que o comportamento das partículas estudadas por Mendel, durante a produção de gametas nas ervilhas, era exatamente o paralelo ao comportamento dos

cromossomos na meiose. Em 1910, Thomas Morgan³ reforça a teoria cromossomal da hereditariedade, em que os genes são partes das estruturas celulares específicas dos cromossomos. Já em 1914, o cientista e pesquisador Theodor Boveri³ afirma que um padrão cariotípico anormal está ligado a um fenótipo maligno da célula em que aparece, então, um cromossomo mutante. Em 1960, que Nowell e Hungerford detectaram a primeira alteração cromossômica em doença neoplásica e descreveram a existência do cromossomo Philadelphia (Ph).^{4,5,6}

Este artigo visa investigar, através de revisão bibliográfica, a evolução das técnicas citogenéticas aplicáveis na detecção da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) enfatizando a urgência da implantação desse tipo de análise no serviço público de Saúde.

ANÁLISE CITOGENÉTICA CLÁSSICA

A citogenética é a parte da genética que estuda os cromossomos (constituído de Ácido Desoxirribonucléico (DNA) e outros complexos protéicos), sua função, estruturas, comportamento biológico, patológico e sua hereditariedade.⁷ Está dividida em citogenética clássica, que envolve a cultura de célula, e a molecular, com uso de técnica e métodos tecnológicos através de DNA e, ainda, a citomolecular, à qual se utilizam sondas específicas.^{2,5,6} Segundo Carakushansky,¹ as anormalidades cromossômicas ocorrem em 0,4% dos nascidos vivos. Elas estão ligadas a alterações no fenótipo e resultam do desequilíbrio das informações genéticas graças a erros advindos da divisão celular. As aberrações cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais, sendo que as primeiras relacionam-se com o número de cromossomos e as outras com alterações estruturais, como translocações recíprocas ou robertsonianas, inversões, duplicações, deleções, entre outras, ocasionadas por quebras cromossômicas. Sempre que as mutações comprometem segmentos relativamente grandes de um cromossomo, sendo permitida sua visualização através de microscópio de luz, elas são denominadas aberrações cromossômicas.

Os cromossomos contêm todas as informações genéticas que são transmitidas aos seus descendentes, material este essencial na análise citogenética. Com a técnica de bandeamento - um método de coloração usado na citogenética em que os cromossomos são submetidos a uma enzima (tripsina) que degrada as proteínas cromossômicas em regiões específicas e individualizadas - é possível visualizar todos os cromossomos com bandas claras e escuras.^{5,6}

Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba, v. 10, n. 3, p. 5-12, 2008

1 - Acadêmica do curso de Biomedicina - Universidade Presidente Antonio Carlos - UNIPAC/MG

2 - Professora adjunta de Genética - UNIPAC

3 - Co-orientadora citogeneticista do Laboratório Côrtes Villela Ltda.

Recebido em 19/3/2008. Aceito para publicação em 14/8/2008.

Contato: wandy.biomed@oi.com.br

Isso tornou possível a determinação segura e confiável dos pares de cromossomos e a detecção da natureza das aberrações cromossômicas de diversas formas neoplásicas. Dessa forma, foi verificada a presença do cromossomo Ph que Nowell e Hungerford (1960) acharam ser uma deleção. A partir da técnica do bandeamento, comprovou-se que tal deleção era, na realidade, uma translocação recíproca, envolvendo os cromossomos 9 e 22.

Segundo o Instituto Fleury,⁵ a importância em diagnosticar a presença de uma alteração citogenética clonal (grupo de células com a mesma anormalidade), como o Philadelphia (Ph), é de que pode-se esclarecer uma situação reacional sobre o estado e a gravidade que se observa na LMC. Assim, a medula óssea é o principal órgão ativo que reflete o estado do sistema hematopoiético observado no sangue periférico.⁸

Para se fazer uma análise cromossômica, as células devem ser capazes de crescer e se dividir rapidamente em meios de cultura. Portanto, as melhores células são os leucócitos, mais especificamente os linfócitos T, por serem capazes de se dividir com maior facilidade e se encontrar em maior concentração na circulação.⁶

A análise citogenética é feita nas células hematopoiéticas, preferencialmente, em amostra da Medula Óssea (MO) por estar em completo processo de divisão celular e conter mais material para análise. Deve-se utilizar como anticoagulante a heparina.⁶ A célula deve estar na metáfase, fase de divisão celular mitótica em que os cromossomos estão condensados, os centríolos estão em pólos opostos na célula, ficando os cromossomos na região mediana e presos pelos centrômeros.

O aspirado da medular, então, passa por uma lavagem com meio específico que também nutrirá as células. Para melhorar a nutrição e o cultivo, utiliza-se também o soro fetal bovino. Incuba na estufa de CO₂ e, logo após, é necessário fazer com que todas as células parem de se dividir. Para tanto, utiliza-se a colchicina (substância capaz de parar a divisão celular mitótica). Agora basta dar um “choque hipotônico” com salina (KCL) por 15 a 20 minutos. Isso causará inchaço e separação dos cromossomos e, ainda, eliminará restos citoplasmáticos. É preciso colocar fixador na diluição 1:3 (ácido acético e metanol).⁵

Devem-se preparar, então, as lâminas para a análise citogenética, sendo necessário que o material seja bem espalhado para ter uma boa visualização. Em seguida, essas lâminas já podem ser coradas com corante convencional (Giemsa ou Leishman). Utiliza-se o bandeamento que melhor auxiliará no diagnóstico. No caso da LMC, o melhor é o bandeamento G. Ao se fazer uma análise de, no mínimo, 20 metáfases, fazendo uma varredura na lâmina e analisando as melhores células. A presença de pelo menos quatro cromossomos Ph + pode levar ao diagnóstico positivo para LMC.

ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR

Segundo o Instituto Fleury,⁵ a citogenética molecular independe de divisão celular, pois está mais ligada à análise do DNA feito por outra metodologia. A citogenética molecular compreende as técnicas de hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH), Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), Hibridação Genômica Comparativa (CGH) e Cariotipagem Espectral (SKY), dentre outras. A técnica de FISH, a qual tem aumentado substancialmente a capacidade de detecção de anormalidades cromossômicas, baseia-se em utilizar sondas marcadas com corante fluorescente, que é uma seqüência de bases complementar ao alvo, que é o DNA com genes específicos. Esta técnica permite detectar uma translocação em qualquer região de qualquer cromossomo, podendo ser no braço curto, no braço longo ou, até mesmo, na região centromérica. A SKY é uma técnica em que são usados corantes fluorescentes que se ligam a regiões específicas do cromossomo.⁹ Uma vantagem tecnológica é o uso de um interferômetro no qual, através de um programa de computador, até as minúsculas variações de cores são posteriormente fotografadas.

BANDEAMENTO

Os métodos de bandeamento para os pares de cromossomos, usados na análise citogenética, são: o bandeamento Giemsa (bandeamento G), que deverá tratar as lâminas já envelhecidas na tripsina (0,10%) por mais ou menos 5 a 10 segundos. Depois, é preciso lavá-las em tampão ou água bidestilada; em seguida, passar em solução corante Giemsa e lavar novamente em água bidestilada. Os pares de cromossomos coram-se de modo característico com bandas claras e escuras (bandas G) e, assim, ocorre a diferenciação individual dos cromossomos. Este método é o mais utilizado nas técnicas de citogenética.

O bandeamento Q requer coloração com quinacrina mostarda ou outros compostos correlatos fluorescentes. A análise é feita em microscópio de fluorescência, onde os cromossomos coram-se em padrão específico de bandas claras com regiões pouco coradas (eucromatina) e escuras (bandas Q), regiões densamente coradas (heterocromatina), sendo que as bandas Q claras correspondem às bandas G escuras. No bandeamento R, as lâminas recebem um tratamento especial com aquecimento antes de fazer a coloração; as bandas escuras e claras (bandas R) resultantes serão o contrário do bandeamento G ou Q. Já no bandeamento C, a coloração é feita por um processo específico que cora a região centromérica de cada cromossomo e outras regiões que possuem heterocromatina. A figura 1 mostra um ideograma do padrão de bandeamento G de um conjunto de cromossomo humano normal, do sexo masculino, com ilustração de bandas claras e escuras para análise e identificação dos 46 números de cromossomos. O padrão de bandas de cada cromossomo é numerado de acordo com cada braço do centrômero ao telômero. Usando esse sistema de numeração, a localização de cada banda e os genes presentes nos cromossomos podem ser descritos sem ambigüidade e com maior precisão.

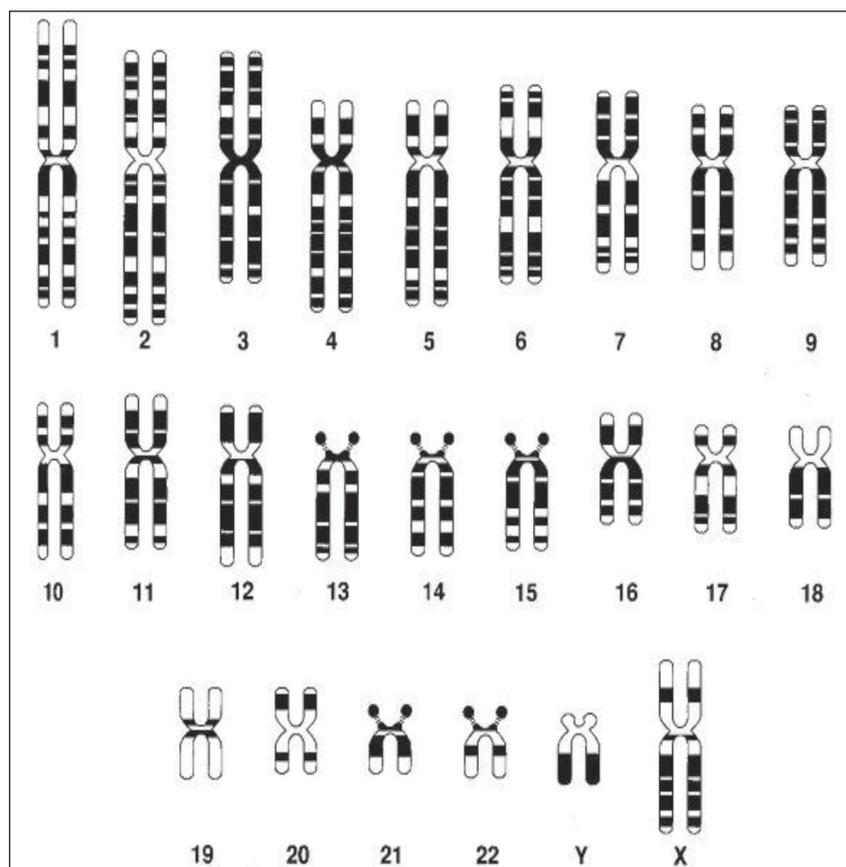


Figura 1. Montagem de ideograma de cariótipo humano do sexo masculino (46, XY). Coloração feita pelo Bandeamento G. Fonte: El cariótipo humano... Disponível em: www.ucm.es/.../practicass/cariotipo/carioP.htm

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Todas as células que contribuem para o corpo humano são somáticas, com exceção das células germinativas (células sexuais). Os 46 cromossomos das células somáticas humanas são compostos de 23 pares. Dentre estes 23, 22 pares são similares entre homens e mulheres e são chamados de autossomos. Devem ser numerados em ordem decrescente do tamanho os demais cromossomos sexuais XX e XY, respectivamente de mulheres e homens.

Qualquer erro no processo de divisão celular pode acarretar em uma mutação celular. As aberrações cromossômicas são classificadas em aberrações numéricas e estruturais. Podem comprometer tanto os cromossomos sexuais como os autossomos.¹ Essas aberrações são decorrentes de erros na divisão celular, que resultam de uma mutação em uma célula germinativa no progenitor ou de mutação somática, como o que ocorre na LMC. A mutação somática ocorre tecido somático em desenvolvimento que formará uma população de células idênticas (clones).²

As mutações de câncer ocorrem em uma categoria de genes celulares normais denominados proto-oncogenes, responsáveis pelo controle positivo da proliferação e regulação da multiplicação e diferenciação celular. Quando as

células sofrem um processo de multiplicação celular totalmente descontrolada, o clone derivado do processo é chamado de tumor.

Segundo Carakushansky,¹ os oncogenes são formas modificadas de genes normais. Griffiths *et al*² afirmam que vários eventos podem transformar um proto-oncogene em oncogene, que promoverá duas características do câncer: a multiplicação desordenada e o crescimento excessivo das células em questão.

Segundo Carakushansky,¹ a alteração cromossômica bem como a mutação gênica são formas e mecanismos de ativação de proto-oncogene. Assim, na citogenética pode-se investigar e mapear vários tipos de oncogenes presentes nos pontos de quebra nos rearranjos cromossômicos não-aleatórios nos tumores humanos.

Nos seres humanos, as células com um número de 23 cromossomos são denominados haplóides. Quando formado qualquer número de cromossomo com múltiplo exato do número haplóide é denominado euplóide. Assim sendo, as células diplóides humanas com mais de 46 cromossomos são chamadas poliplóides. Já as células que desviam dos múltiplos do número haplóides são denominadas aneuplóides, ou seja, indicando a ausência ou presença extra de um cromossomo.¹

As aberrações estruturais estão envolvidas com as mudanças da estrutura dos cromossomos. Ocorre quebra em determinadas regiões, formando novos rearranjos que, em consequência, poderão causar uma anormalidade cromossômica com características fenotípicas normais ou não. Quando ocorre quebra em apenas um dos braços do cromossomo, esse pode ser reconstituído com mecanismo de reparo da própria célula e sem alteração em seus genes; mas, quando se trata de mais de uma quebra, os mecanismos de reparo podem não conseguir distinguir uma extremidade adesiva da outra, unindo-as de forma errada e alterando, assim, os genes e a função metabólica.

Temos as translocações, troca de material genético entre dois cromossomos não-homólogos em que não ocorre perda ou adição de material genético (translocações recíprocas balanceadas); as recíprocas não-balanceadas, em que ocorrem trocas de material genético entre os cromossomos e perda de segmentos;¹ e as translocações robertsonianas, em que ocorre a adesão de um cromossomo inteiro a outro geralmente acrocêntrico.

Segundo Nussbaum *et al.*,⁶ as translocações estão presentes em cerca de 1 em 375 neonatos, e a troca cromossômica ocorre espontaneamente em uma frequência baixa, mas também pode ser induzida por agentes causadores de câncer, tais como radiações ionizantes, infravermelhos e outras químicas.

Os cromossomos resultantes das translocações recíprocas são denominados derivativos. Segundo Carakushansky,¹ os portadores desse tipo de translocação são fenotipicamente normais, mas também podem estar sob o risco de ter uma prole com cromossomos anormais e abortos devido à anormalidade de segregação ocorrida nos gametas.

CARIÓTIPO

O cariótipo é o conjunto de cromossomos arranjados e visualizados de indivíduo ou de uma espécie (cariótipo humano). Para se montar um cariótipo, os cromossomos devem estar bem condensados e preferencialmente na fase de divisão celular na metáfase, pois nesta fase, tanto os cromossomos quanto as cromátides poderão ser vistos ao microscópico, facilitando a análise citogenética.

O centrômero, segundo Griffiths *et al.*,² é a estrutura à qual se ligam as fibras do fuso e divide o cromossomo em dois braços: um braço curto designado por p (de *petit*) e um outro braço longo designado por q. Assim, os cromossomos humanos serão classificados pela posição do centrômero: metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico.

No metacêntrico, o centrômero fica próximo ao centro

e os braços são aproximadamente do mesmo tamanho. No submetacêntrico, o centrômero fica fora do meio, próximo de uma extremidade e os braços são visivelmente diferentes no tamanho. No acrocêntrico, o centrômero fica bem próximo da extremidade do braço. Temos também o telocêntrico, em que o centrômero fica em um único braço, porém, não ocorre no cariótipo humano, mas pode aparecer em alguns rearranjos cromossômicos.^{5,6} A figura 3 mostra a foto de um cariótipo humano com LMC (abaixo da seta).

A nomenclatura para descrição do cariótipo segue normas estabelecidas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN) de 1995. Um cariótipo normal é designado como 46, XX ou 46, XY. Sendo assim, a presença de uma translocação entre dois cromossomos, tal como na LMC, é designada pela letra minúscula t seguida, entre parênteses, dos dois cromossomos envolvidos separados por ponto e vírgula e novamente entre parênteses o braço e a banda, respectivamente, de cada cromossomo envolvido. Exemplo: 46, XX, t(9;22)(q34;q11.2).⁵

CROMOSSOMO PHILADELPHIA

O cromossomo Philadelphia é o resultado de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22,^{2,10,11} que foi devido a um erro no processo de divisão celular, derivando em um cromossomo que produz uma proteína de origem quimérica. O Ph é também um marcador da leucemia mieloide crônica. Detectado por citogenética clássica em 90% - 95% dos indivíduos com LMC, e pode ocorrer em 2% - 10% em rearranjos variantes, decorrentes tanto de simples aberrações, envolvendo a região 22q11, como rearranjos decorrentes de alterações complexas envolvendo ambas as regiões 9q34 e 22q11.2 com um terceiro ou mais cromossomos.¹² Essa translocação t(9;22)(q34;q11.2) justapõe o oncogene ABL (Abelson Leukemia Vírus), mapeado no cromossomo 9, que codifica uma proteína tirosina quinase, e o gene BCR (Breakpoint Cluster Region), mapeado no cromossomo 22. Este é responsável, em condições normais, por codificar uma proteína que regula o ciclo celular. A proteína mutante BCR/ ABL apresenta uma atividade tirosina quinase elevada pela patogênese da doença. O neogene BCR/ABL transforma a célula hematopoiética normal em células malignas e apresenta uma mieloproliferação contínua que resulta em proliferação, alteração da adesão celular progenitora às células estromais e à matriz extracelular, conferindo resistência à apoptose celular independente de agentes indutores.^{6,11} A figura 2 mostra a translocação entre os cromossomos 9 e 22 e suas regiões específicas dos genes que sofreram a translocação feita por citogenética molecular.

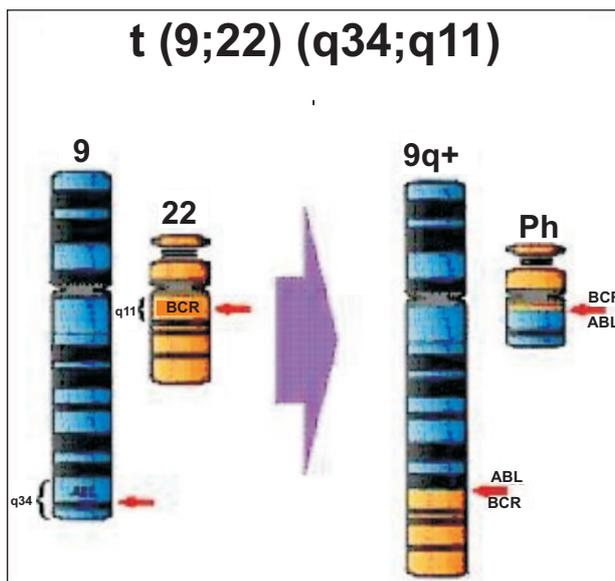


Figura 2. Translocação entre os cromossomos 9 e 22, originando o cromossomo Ph. Fonte: disponível em: www.unesp.br/prope/projtecn/Saude/saude48a.htm

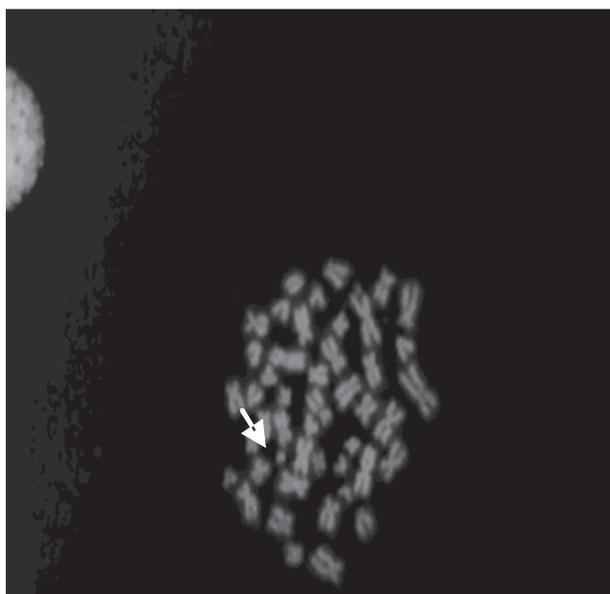


Figura 3. Foto de uma paciente com LMC e a presença do cromossomo Ph, o menor cromossomo, abaixo da seta. Fonte: Laboratório Côrtes Villela.

LEUCEMIA

A leucemia é um câncer que envolve os leucócitos, ou glóbulos brancos, responsáveis pela defesa do organismo humano.⁵ A LMC é uma expansão clonal da célula progenitora hematopoética, e para Oliveira *et al*⁷ constitui 14% de todas as leucemias. Sua incidência é de 1,6 casos a cada 100.000 habitantes. O marcador molecular da doença é o cromossomo Ph.^{5,13} A presença desse marcador tem como principal objetivo atualizar diagnóstico e tratamento, considerando métodos clássicos e técnicas avançadas como protocolo para LMC.¹³ O aspirado medular, portanto, além de ser o método de avaliar a

quantidade de medula óssea (MO) informa a natureza do crescimento e a origem da maturação celular.

A leucemia é uma proliferação neoplásica generalizada ou acúmulo de células hematopoiéticas que quando anormal na sua fase de maturação não exercem suas funções celulares, podendo ou não ocorrer extravasamento do sangue periférico.¹⁴ Portanto, muitas vezes, ocorre extravasamento das células leucêmicas para o sangue circulante, que podem ser vistas em maior quantidade além do normal. As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular presente no sangue e seu grau de maturação. Compreendem duas fases: a aguda e a crônica.

Na fase aguda, a MO fica recoberta de células primitivas (blastos) das séries celulares envolvidas, com pouca diferenciação celular da linhagem específica. Esta fase caracteriza-se pela proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo (anaplasia) variável, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias.¹⁵ E, portanto, pode ser fatal dentro de três meses. Na fase crônica, a sobrevivência é maior, podendo passar de um ano após instalação

dos sintomas. O tipo celular encontrado nesta fase é bem diferenciado, ou seja, encontram-se todas as linhagens hematopoéticas matura, imatura e com pouco blasto na circulação. Para avaliar e saber se a origem das células são mielóide ou linfóide, basta ver o tipo celular predominante na diferenciação celular. A figura 4 mostra como é produzida toda a linhagem hematopoéticas de um indivíduo humano a partir de uma célula pluripotente da MO.

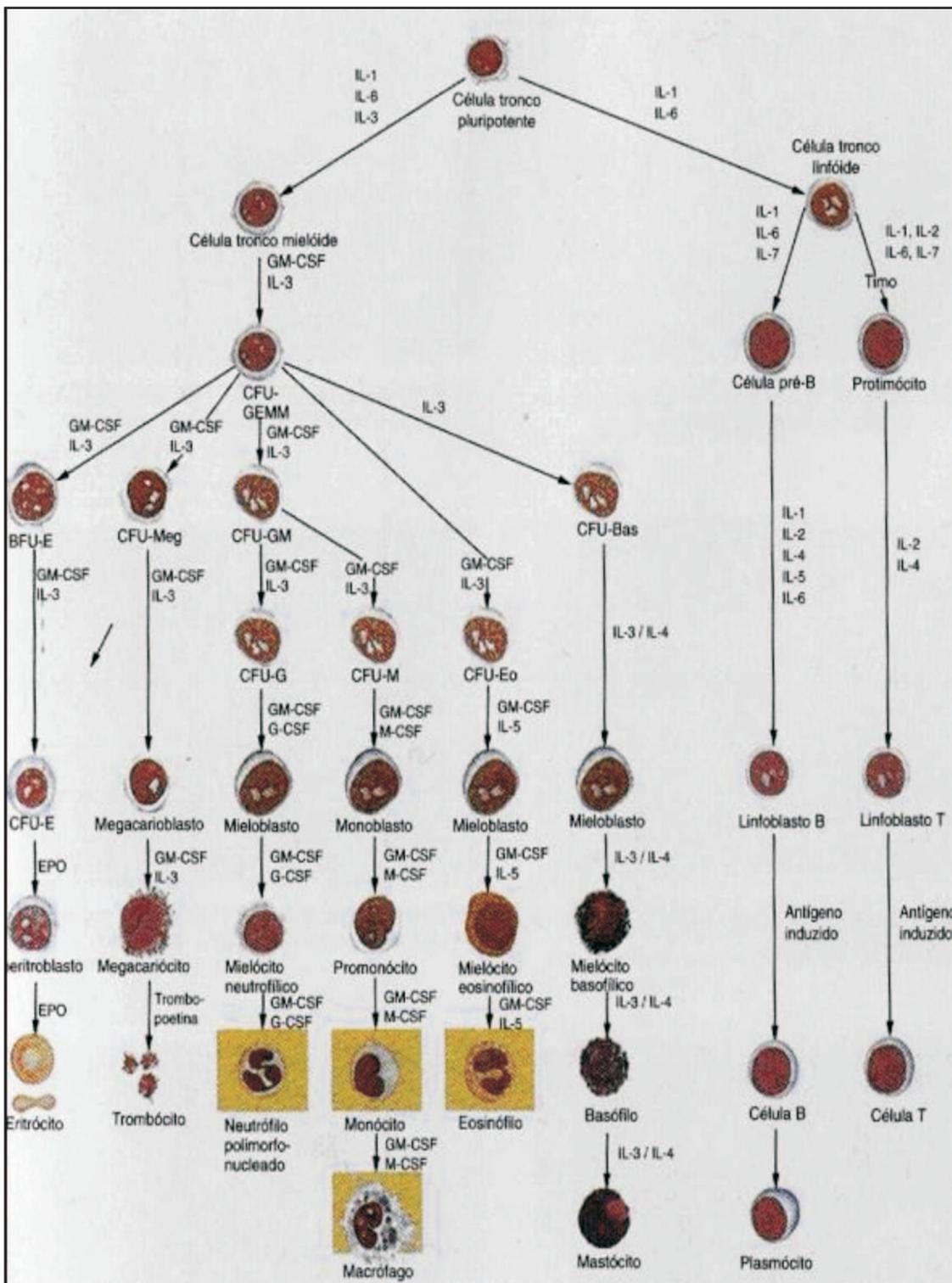


Figura 4. Diferenciação das células hematopoéticas. Fonte: Sacher RA, Mcpherson RA. Widmann interpretação clínica dos exames laboratoriais. 11ª ed. São Paulo: Manole; 2002, p. 532.

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A LMC é uma doença clonal maligna de célula progenitora hematopoiética da linhagem mielóide, com intensa proliferação medular e periférica, esplenomegalia e anemia.^{5,14,15,16,17,18} Contribui com 15 % da leucemia adulta que em criança é raro e tem uma incidência de 1 a 2 por 100.000 em adultos.⁶ É caracterizada pela presença do cromossomo Ph, após translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 em que encontramos o gene híbrido BCR/ABL na análise molecular.^{5,6,19,20} Com essa translocação, o rearranjo formado dá origem a uma proteína de origem quimérica.^{5,6} A proteína, normalmente produzida pelo gene ABL normal (p145^{ABL}), age entre o núcleo e o citoplasma. Sua superexpressão leva à inibição do ciclo celular na fase G1/S. O principal efeito funcional da fusão BCR/ABL parece ser o aumento na atividade tirosina quinase que está envolvida em várias vias de transdução de sinais, alguns dos quais levam à ativação do oncogene RAS.⁵ A proteína de fusão BCR/ABL interfere com apoptose, que na LMC a morte celular programada é inibida. Assim, as células sobrevivem um tempo maior na circulação maior que o normal, acumulando-se em vários órgãos e tecidos.^{19,21}

Sabe-se que cerca de 95% dos pacientes com LMC apresentam a translocação entre os cromossomos 9 e 22, resultando no cromossomo Ph, nas células da MO, e o restante apenas tem uma translocação complexa ou variante,^{5,6} isto é, podem apresentar rearranjos com outras regiões de outros cromossomos, tais como os 34 e 11.

A LMC tem um curso clínico bifásico ou trifásico,¹⁶ constituído pela fase crônica que pode durar três a quatro anos. Ressalta-se que a doença pode ser controlada com o uso de medicamentos mielossuppressores, como bissulfato ou hidroxiuréia. Estes, segundo o Instituto Fleury,⁵ podem levar à regressão do tamanho do baço e, com isso, melhorar o resultado do hemograma. Porém, na citogenética, ocorrerá a persistência do clone Ph na MO. O interferon (α -IFN), com ou sem associação a outras drogas, como a citrabina ou hidroxiuréia, pode levar à remissão clínica, hematológica e citogenética em cerca de 20% dos pacientes, portanto, deve-se confirmar por PCR se a pesquisa do cromossomo Ph foi negativa (Ph -). Pois através do PCR tem-se grande importância em analisar a presença do gene híbrido BCR/ABL ou outros genes translocados e, assim, descartando total inexistência do Ph+. Já que os pacientes Ph- possuem uma sobrevida menor em relação aos Ph+.

Segundo o Instituto Fleury,⁵ há uma graduação para a interpretação do desaparecimento do Ph sendo considerada boa a resposta quando há menos de 35% de células Ph+, tendo esse paciente estimativa de sobrevida média de 90% em cinco anos. O PCR tem sido positivo nos pacientes em remissão citogenética em uso de α -IFN à medida que não há a erradicação do clone maligno, mas não tem sido associado à recaída iminente. Já na fase acelerada, ocorre quando o paciente não consegue responder às doses habituais de medicação e seu quadro clínico piora de uma hora para outra, com dores ósseas, febre, anemia rigorosa, leucometria global incontrolável.⁵ Portanto, ao se fazer a análise citogenética, na maioria dos casos, já se torna possível detectar anormalidades adicionais ao Ph inicial. Sendo, porém, as mais freqüentes envolvendo os cromossomos +8, +21, +19, i (17q). Na última fase blástica ocorre parada de maturação celular em algum nível de

desenvolvimento.

Segundo Guyton,¹⁶ a patologia da LMC é caracterizada por hiperplasia mielóide com números elevados de célula mielóide em diferenciação no sangue e na medula óssea. O cromossomo Ph é facilmente detectado por análises citogenéticas na maioria dos casos. Porém, com o uso da biologia molecular podem-se usar as técnicas de PCR para análise do rearranjo BCR/ABL em que não foi possível detectar a presença do cromossomo Ph na citogenética clássica. No início da doença, os sintomas são, geralmente, insidiosos e o diagnóstico é feito quando se realiza uma contagem hematopoiética. Isso pode ser feito através de um hemograma que analisa toda presença da linhagem de células hematopoiéticas do sangue que, possivelmente, levará a suspeitar de uma leucemia. Ocorre a presença de anemia, o número exagerado da série branca (leucócitos) e desvio à esquerda das células sanguíneas. Pode-se fazer uma análise citogenética para observar a presença da anormalidade cromossômica.

O mesilato de Imatinib (STI571, Glivec) é um inibidor seletivo da proteína tirosina quinase codificado pelo gene BCR/ABL, portanto, é o tratamento mais utilizado nos últimos tempos. Esta droga se liga especificamente à proteína quimérica p210 kD, que atua nos clones celulares Ph+.¹⁸ A STI571 representa uma nova classe de remédios que interferem na multiplicação celular, chamada inibidores de transmissão de sinal. Mediante uso oral, tem como alvo seletivo e específico nas células cancerígenas da LMC e bloqueia os mecanismos que sinalizam a ordem crescente da célula do tumor.²²

Apesar de ser muito eficaz nos pacientes em fase crônica da LMC, a maioria dos pacientes tratados nas fases avançadas, apresenta falhas de respostas ou recaídas após uma resposta inicial ao tratamento. Mutações no domínio quinase do gene híbrido BCR/ABL são os mecanismos mais associados à resistência, ocorrendo a diminuição da sensibilidade ao mesilato de Imatinib nesses pacientes.²⁰ Durante a fase crônica, os leucócitos são facilmente controlados com hidroxiuréia ou com interferon α .¹⁶ Já em criança, mais difícil de adquirir a doença, o melhor é o transplante entre doador alogênico com compatibilidade Antígeno Leucocitário Humano (HLA).

O prognóstico é dado através de uma correlação entre as alterações cromossômicas e a leucemia e que conferirá um bom ou pior prognóstico para o paciente. Por isso, a presença do cromossomo Ph confere maior sobrevida aos pacientes, o que não ocorre com os Ph negativos, os quais devem fazer testes confirmatórios para excluir totalmente a não-presença do cromossomo Ph.

O cromossomo Ph é encontrado em 90% a 95% dos pacientes e os Ph negativos são as pessoas mais idosas, têm leucocitose, plaquetas baixas com resposta fraca à terapia e a sobrevida desses pacientes é bem mais curta.^{5,9,14,23,24}

Segundo Fett-Conte *et al.*,⁹ o paciente com LMC e cromossomo Ph no cariótipo apresenta evolução clínica melhor, sobrevida maior e prognóstico mais favorável que aquele sem o Ph que, geralmente, responde mal ao tratamento e apresenta uma sobrevida mais curta.

Segundo o Instituto Fleury,⁵ há uma graduação para a interpretação do desaparecimento do Ph, sendo considerada boa a resposta quando há menos de 35% de células Ph+.

CONCLUSÃO

Há cerca de duas décadas, os protocolos de tratamento para neoplasias malignas têm utilizado as informações oriundas das análises citogenéticas clássicas e citomoleculares para estratificar pacientes em diferentes categorias terapêuticas. Cada vez com melhores resultados, tais técnicas têm aplicabilidade no diagnóstico da leucemia mielóide crônica. Portanto, reforçamos a urgência e extrema necessidade de se implantar no serviço público de Saúde laboratórios responsáveis por análises citogenéticas e citomoleculares. Ressaltamos que o prognóstico e o acompanhamento clínico dos pacientes têm demonstrado grande ênfase e melhoria graças à adequação aos medicamentos utilizados. Minimizar o tempo decorrido para liberação do diagnóstico correto é de suma urgência para que se possa utilizar a medida terapêutica mais adequada ao tratamento o mais rápido possível. Frisamos, também, a importância da prevenção e dos cuidados com a manipulação de substâncias que comprovadamente são responsáveis por causar mutação celular que induzem a diferentes tipos de câncer.

Agradecimentos

À orientadora Vera Maria Valporto Oliveira dos Santos, pelo incentivo e acompanhamento ao longo do curso.

Ao Laboratório Côrtes Villela, por abrir as portas para realização de estágio na área de Citogenética.

À co-orientadora Mellissa Veith, que se disponibilizou a ensinar, auxiliar e acompanhar toda a técnica em Citogenética, aprimorando o aprendizado no estágio extracurricular.

REFERÊNCIAS

1. Carakushansky G. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
2. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart, WM. Introdução à genética. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
3. Martins LAP. Thomas Hunt Morgan e a teoria cromossômica: de crítico a defensor. *Episteme: Filos Hist Ciênc Rev.* 1998; 3(6):100-26.
4. Grouchy JNC, Cantu JM, Pasquier GB, Bousser J. Models for clonal evolutions: a study of chronic myelogenous leukemia. *Am J Human Genet.* 1966; 18(5):485-6.
5. Instituto Fleury. A citogenética clássica e molecular em Hematologia [homepage na Internet]. São Paulo: o Instituto; 2007 [atualizada em 24 ago 2007; acesso em 28 set 2007]. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/ACitogenéticaClássicaeMolecularemHematologia.aspx>
6. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genética médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
7. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Fundamentos de Nelson tratado de pediatria. Tradução de: Márcio Moacyr de Vasconcelos. 16ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.
8. Carvalho WF. Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia. 7ª ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1999.
9. Fett-Conte AC, Vendrame-Goloni CB, Homsy CM, Borim LNB, Zola PA, Ricci O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto SP. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000; 22(3):374-86.
10. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia molecular da célula. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 1997.
11. Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fast-FasL. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005; 27(2):120-5.
12. Jamur VR. Estudo citogenético de paciente com leucemia mielóide crônica tratados com o mesilato de imatinibe [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
13. Oliveira CM, Lemos JAR. Leucemia mielóide crônica: novos rumos para diagnóstico e tratamento. *Rev Para Med.* 2002; 16(4):7-16.
14. Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19ª ed. São Paulo: Manole; 1999.
15. Silva GC, Pilger DA, Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(2):77-84.
16. Guyton AC. Tratado de fisiologia médica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
17. Sacher RA, Mcpherson RA. Widmann interpretação clínica dos exames laboratoriais. 11ª ed. São Paulo: Manole; 2002.
18. Stanley RS. Técnicas de laboratório. 4ª ed. São Paulo: Manole; 1986.
19. Gabriel AS, Tristão CK, Santos NB, D'ávila VL, Cliquet GM. Perda súbita da audição e infiltração neoplásica de sistema nervoso central como complicação da leucemia mielóide crônica. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba.* 2007; 9(2):15-8.
20. Ichihara EP, Pagnano KBB. Mutações de ponto do gene BCR/ABL em paciente com leucemia mielóide crônica resistentes ao mesilato de imatinib (glivec). In: XII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP; 2004; Campinas [acesso em 27 jul 2007]. Disponível em: www.prt.unicamp.br/prbic/congresso/XIIcongresso/livrotc.pdf
21. Chauffaille MLLF. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005; 27(2):79-82.
22. Droga para leucemia deve abrir caminho para novos medicamentos. *Folha Online.* 27 abr 2001; Ciência e saúde [acesso em 30 out 2007]. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u3460.shtml>
23. Instituto Fleury. Leucemia mielóide crônica pode ser acompanhada por teste molecular [homepage na Internet]. São Paulo: o Instituto; 2007 [atualizada em 01 ago 2007; acesso em 18 set 2007]. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/RevistaMedicinaESaude/pages/56Leucemiamielóidecrônicapodeseracompanhadaportestemolecular.aspx>
24. Wallack J. Interpretação dos exames de laboratório. 4ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica; 1989.