Academia de Ciência e Tecnologia
Rua Bonfá Natale, 1860 Bairro Santos Dumont
CEP: 15020130 - São José do Rio Preto, SP

LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA: FISIOPATOLOGIA E MÉTODOS DIAGNÓSTICO

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: PATHOPHYSIOLOGY AND DIAGNOSTIC METHODS

LIMA, Kevilin Beatriz; Pós-Graduação "Lato-Sensu" em Hematologia Clínica Laboratorial.
Coordenadores do Curso: Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum; Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum
kevilinbeatrizdelima@gmail.com

RESUMO. Introdução: A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa causada pela mutação do cromossomo Filadélfia (Ph), que causa uma translocação entre os cromossomos 9-22, levando à produção de oncoproteínas. A contagem de leucócitos pode ser detectada através do hemograma completo e as oncoproteínas pela análise citogenética, aspiração e biópsia de medula óssea, FISH (hibridização fluorescente in situ) e RT-PCR (reação em cadeia da polimerase). Nos métodos cada vez mais avançados e específicos, as principais ferramentas de diagnóstico são hemograma completo e, em conjunto o RT-PCR que identifica com precisão as mutações do paciente, fornecendo assim uma melhor orientação para o tipo de leucemia e tratamento adequado. **Objetivos:** Este trabalho tem como objetivo descrever a fisiopatologia da LMC e seus métodos de diagnóstico laboratorial. **Material e Métodos:** Este estudo fornece uma revisão bibliográfica das principais técnicas diagnósticas da LMC. **Resultados Esperados:** Melhor conhecimento das técnicas utilizadas no diagnóstico da LMC no geral, com foco em biologia molecular e hemograma completo.

Palavras-chave: Leucemia mieloide crônica. Diagnóstico LMC. Biologia molecular. BRC-ABL. Cromossomo Philadelphia.

ABSTRACT. Introduction: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease caused by a mutation in the Philadelphia chromosome (Ph), which causes a translocation between chromosomes 9-22, leading to the production of oncoproteins. The leukocyte count can be detected by complete blood count and oncoproteins by cytogenetic analysis, bone marrow aspiration and biopsy, FISH (fluorescent in situ

hybridization) and RT-PCR (polymerase chain reaction). In increasingly advanced and specific methods, the main diagnostic tools are complete blood count and, together, the RT-PCR that accurately identifies the patient's mutations, thus providing better guidance for the type of leukemia and the appropriate treatment. **Objectives:** This work aims to define the pathophysiology of CML and its laboratory diagnostic methods**.** **Material and Methods:** This study offers a literature review of the main diagnostic techniques of CML. **Expected Results:** Better knowledge of the techniques used in the diagnosis of CML in general, with a focus on molecular biology and complete blood count.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia. CML Diagnosis. Molecular Biology, BCR-ABL. Philadelphia Chromosome.

INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença neoplásica a qual se caracteriza por intensa proliferação celular ou acúmulo de células hematopoiéticas na medula óssea (local de fabricação das células sanguíneas) com ou sem envolvimento do sangue periférico. Na leucemia, as células sanguíneas imaturas sofrem mutações genéticas, transformando-as em células cancerosas. Essas células anormais não funcionam normalmente, reproduzem-se rapidamente e morrem menos do que as células normais. Desta forma, as células sanguíneas saudáveis na medula óssea são substituídas por células cancerosas anormais. (LEUCEMIA. Instituto Nacional do Câncer, São Paulo, 04 de Março de 2020. Disponível em: <http://ww.inca.gov.br/tipos-de-câncer/leucemia>. Acesso em: 10, Maio de 2021).

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é caracterizada por uma anormalidade citogenética específica distinguida por uma translocação dos cromossomos 9 e 22, também conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph+), que através da fusão entre os genes BCR-ABL, traduz uma proteína de origem oncogênica com atividade tirosina quinase que começa a ser produzida de forma excessiva. Esta enzima específica está presente em mais de 90% dos casos de LMC, sendo responsável por 20% de todas as leucemias. Apresenta maior frequência em adultos, com idade entre 40 a 60 anos, principalmente do sexo masculino. Contudo, pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias, com menos de 10% dos casos de pacientes com até 20 anos. (Cruz PS, Santos MLSC dos Santos; 2017).

Alguns dos pacientes apresentam fase crônica que possui leves sinais e sintomas, que quando tratadas com fármacos convencionais, duram de três a cinco anos; ou uma fase acelerada, com surgimento de blastos no sangue periférico e/ou na medula óssea; fase aguda, também conhecida como crise blástica, com duração de três a seis meses, por sua evolução ser rapidamente fatal. Existem casos em que a leucemia pode evoluir da fase crônica para a crise blástica devido a evolução clonal causada pela alta proliferação causada pelo gene BRC-ABL. (Sossela, Fernanda Roberta et. Al, 2017).

O diagnóstico da LMC é baseado na contagem dos leucócitos, granulócitos imaturos e basófilos. Apesar do surgimento de técnicas cada vez mais sensíveis e específicas, o hemograma é essencial na triagem, pois na maioria dos casos os pacientes não apresentam sintomas aparentes. É indicativo da doença se na contagem aparecer de 1 a 19% de blastos, basófilos acima de 20% e leucócitos acima de 30.000/mm³. Porém a identificação depende da demonstração do cromossomo Ph+, que em alguns casos não conseguem detectar esta alteração, sendo necessário utilizar métodos moleculares. (Ver. Assoc. Med. Bras., 2013).

Diante disso, é importante ter um maior entendimento sobre esta patologia, como os laboratórios clínicos podem colaborar no diagnóstico precoce da doença, com ênfase nas alterações observadas no hemograma.

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica de artigos no banco de dados Google Acadêmico. Para isso foi utilizado como termos da pesquisa, “Métodos de diagnóstico da LMC”, “Leucemia Mieloide Crônica”’ e “Aspectos clínicos da LMC”, tendo como critérios de inclusão trabalhos realizados nos períodos de 2008 a 2020”. Como critério de exclusão foi considerado todos os artigos que fugissem do tema proposto ou que estavam fora do período estipulado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce da LMC pode agilizar o início do tratamento e aumentar a chance de cura, por isso é importante entender os métodos diagnósticos disponíveis atualmente. O hemograma ainda é a chave para o diagnóstico patológico, mas novos métodos aprimoraram o diagnóstico tais como a citometria de fluxo que avalia as populações celulares normais e neoplásicas, a citogenética que estuda a morfologia dos cromossomos, a hibridização in situ por fluorescência (FISH) que avalia os cromossomos e identifica pequenas alterações e a genética molecular qualitativa e quantitativa que identifica a mutação e acompanha sua evolução durante o tratamento.

Muitas dessas técnicas laboratoriais complementares são usadas para identificar anormalidades tumorais específicas com maior sensibilidade e são selecionadas com base no estágio da doença e no tipo de amostra. (LAGO, Camila; PETRONI, Tatiane Ferreira; 2017).

Hemograma

O hemograma é o primeiro passo para a investigação laboratorial do paciente que supostamente esteja adoecido. Este exame tem como parâmetros analíticos uma contagem diferencial buscando medir os números de leucócitos, eritrócitos e plaquetas em uma amostra de sangue, também mede a quantidade de hemoglobinas dentro das hemácias, além de incluir contagem diferencial dos tipos de leucócitos. Em estágios iniciais da doença, os principais aspectos observados no sangue periférico são o aumento de basófilos, trombocitose e um baixo escore de fosfatase alcalina leucocitária (LAP). (Sossela, Fernanda Roberta et. Al, 2017).

Ocorre o aumento do total de leucócitos, de neutrófilos e começam a surgir células imaturas. Essa observação se dá através da coleta de amostra do paciente, o mesmo passa por uma máquina que analisa a quantidade celular e diferencia globalmente as células presentes, consequentemente será feito um esfregaço sanguíneo periférico, onde o sangue é colocado em uma lâmina, devidamente tingida com corantes próprios e analisados microscopicamente. Ressaltando que o responsável que irá analisar, permitirá evidenciar o tamanho, formato e proporção de todas as células presentes, esclarecendo aparecimentos de células imaturas e identificando-as. Em alguns pacientes, há alterações cíclicas na contagem de leucócitos em intervalos de 50 a 70 dias, com uma fase de níveis leucêmicos e uma fase de níveis normais. Nas fases iniciais, há necessidade de estabelecer diagnóstico diferencial entre LMC, neutrofilia reacional e outros tipos de leucemias mieloides. (Sossela, Fernanda Roberta et. Al, 2017).

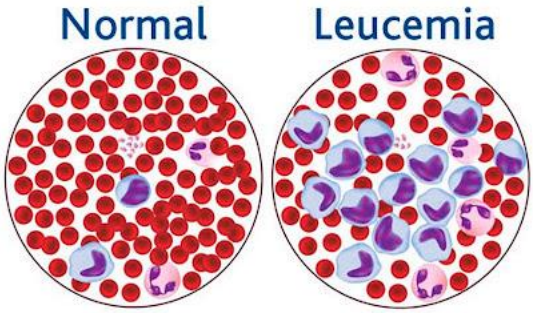

Imagem 1: Num hemograma normal, contém as células vermelhas, células brancas e plaquetas. Num hemograma em pacientes com leucemia, há produção exagerada de células brancas, diminuindo a produção de hemácias e plaquetas.

Sendo assim, o hemograma é uma ferramenta importante para a identificação da LMC e é imprescindível que sua interpretação seja feita corretamente para um direcionamento preciso no diagnóstico, pois é com ela que será possível além de diagnosticar, distinguir a fase em que se encontra a leucemia do paciente. (Sossela, Fernanda Roberta et. Al, 2017).

Mielograma

No âmbito medular, o diagnóstico pode ser realizado por meio do mielograma e biópsia de medula. A medula óssea dos pacientes com LMC é hipercelular, em função da hiperplasia mieloide, apresentando células em todas as fases de maturação, e a série eritroide encontra-se diminuída. Pode ser observada ainda proliferação de megacariócitos, diferentes graus de fibrose reticulínica e vascularização.

A avaliação de esfregaço de aspirado de medula óssea corado por Leishman ou May-Grünwald-Giemsa, deve ser feita de imediato como forma de análise preliminar da morfologia e direcionamento dos demais exames. A primeira avaliação diz respeito ao aspecto da amostra, isto é, se ela é adequada para o diagnóstico, pois aspirados hemodiluídos ou secos podem não refletir a verdadeira situação da medula óssea. O aspirado de medula óssea é hipercelular à custa de aumento marcante de neutrófilos e precursores

o que leva a relação de leucoeritroblastica para 20:1. A sequência de diferenciação é mantida, mas com predomínio de células mais jovens como promielócitos e mielócitos. O número de megacariócitos também é aumentando. Observam-se ainda macrófagos contendo pigmentos azulados ou por vezes

Tabela 1 - Perfil do hemograma nas diferentes fases da LMC

Fase da doença	Parâmetro analisado	Valores encontrados
Fase Crônica	Leucograma	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose (> 50.000 leucócitos/mm^3), com desvio à esquerda
	Diferencial	Predomínio de neutrófilos e mielócitos Contagem ↓ metamielócitos Raros promielócitos Presença de até 10% de blastos Basófilos e Eosinófilos ↑
	Eritrograma	Anemia normocítica e normocrômica Presença de eritroblastos
	Plaquetas	Valor normal ou ↑
Fase Acelerada	Leucograma	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose crescente (> 100.000 leucócitos/mm^3)
	Diferencial	↑ Blastos (10 a 19%) ↑ Basófilos (≥ 20%)
	Eritrograma	Anemia crescente
	Plaquetas	< 100.000 ou > 1.000.00
Crise blástica	Leucograma	
	Diferencial	↑ Blastos (>20%)

Adaptado de: Bain, 2004; Bollman & Giglio, 2011; Bortolheiro & Chiattone, 2008; Grando & Wagner, 2008; Swerdlow et al., 2008; Xavier et al., 2010

assemelhando-se a célula de Gaucher.

Diagnóstico Molecular

As investigações moleculares podem estabelecer um diagnóstico quando os detalhes morfológicos são inconclusivos ou nos indicar especificamente a presença da LMC. A presença de anormalidades genéticas específicas pode determinar a progressão clínica e determinar o estágio da doença. Para que haja um reconhecimento do cariótipo específico da LMC, representado pelo cromossomo Philadelphia (Ph), precisamos conhecer as diversas possibilidades as quais ela pode se apresentar, podendo ter apenas a presença do cromossomo Ph clássico variante simples ou variante complexo, clássico com alterações adicionais, evolução clonal, ausência do cromossomo Ph (podendo ter ou não o cromossomo mascarado) ou outras anomalias na ausência do cromossomo Ph. (LAGO, Camila; PETRONI, Tatiane Ferreira; 2017).

Imagem 2: Diferentes fases da LMC.

Na forma simples, ocorre a participação de um cromossomo extra, como por exemplo, t(9; 22; 6) e o complexo conta com a participação de dois ou mais cromossomos extras, por exemplo, t(1; 9; 22; 11). O cromossomo Ph variante pode implicar doença de comportamento agressivo devido ao fenômeno de instabilidade genômica. Ele pode ser formado simultaneamente ao evento biológico que originou a t(9; 22) ou pode ser originado de dois eventos sucessivos, o primeiro que deu a t(9; 22) e a segunda que envolveu outros dois cromossomos e originou a forma complexa, tendo esta última eventualidade considerada como evolução clonal, podendo ser detectada na fase de CB. (CHAUFFAILLE, 2010).

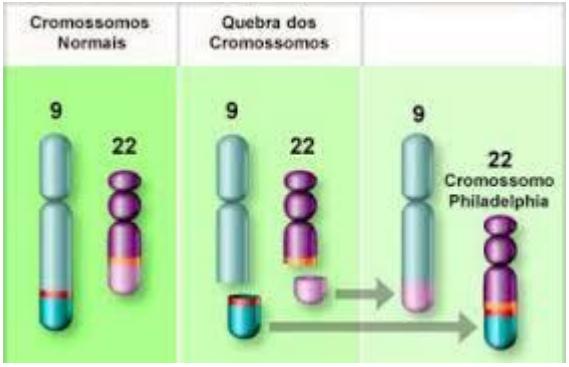

Imagem 3: Cromossomo Philadelphia.

Cariótipo

A citogenética tem como objetivo analisar os cromossomos e, assim, identificar alterações cromossômicas relacionadas às características clínicas da

pessoa. Dividida entre citogenética clássica - que envolve o cultivo celular -, molecular - com uso de métodos utilizando o DNA - e citomolecular, em que se utiliza sondas específicas, este exame é preferencialmente realizado em células de medula óssea. (ELIAS, Larissa Fernanda Queiroz, 2008).

Para a análise citogenética a célula deve estar na fase metáfase, fase em que os cromossomos estão condensados deixando os cromossomos presos pelos centrômeros. Estas células então, irão passar por processo de lavagem, incubação em meio adequado para seu crescimento, choque hipotônico para sessar sua divisão e então serão preparadas em lâminas para a leitura. É considerado positivo para LMC em casos em que haja presença de pelo menos quatro cromossomos Ph+. (MONTENEGRO, Valéria da S. et al, 2018).

FISH e PCR

Nos casos em que não se encontra o cromossomo Ph, deve-se investigar a presença do rearranjo BCR-ABL por FISH ou PCR após a conversão do mRNA extraído das células leucêmicas em DNA complementar (cDNA). Para esta etapa inicialmente utiliza-se uma enzima conhecida como transcriptase reversa (RT). A etapa seguinte é a amplificação da sequência genética a ser estudada, utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores, que chamamos de primers, e a detecção dos transcritos. (ELIAS, Larissa Fernanda Queiroz; 2008).

Os métodos de FISH e RT-PCT, tem sido utilizado em casos em que o cariótipo não apresenta alterações compatíveis com a doença, mas a suspeita de LMC persiste. (GOMES, Silvana Elias, 2020).

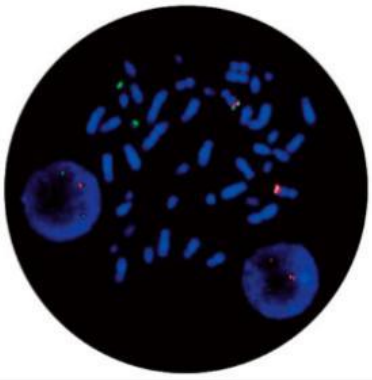

Imagem 4: Translocação do gene BCR-ABL pelo método de FISH

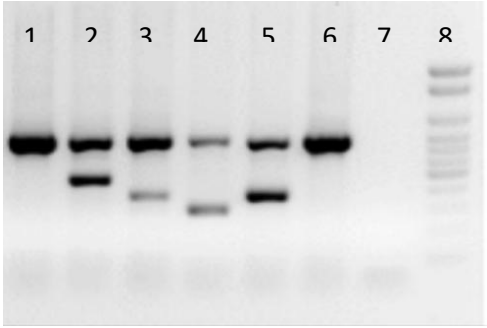

Imagem 5: Gel de eletroforese para análise de PCR no qual 1 é a amostra de um paciente, 2-5 são controles positivos das diferentes formas em que se apresenta a mutação BCR-ABL, 6 é o controle negativo, 7 é o controle branco (contendo apenas os reagentes utilizados no mix para garantir que não houve contaminação e que os reagentes estão bons para uso) e 8 que é um ladder de 100 pares de bases para comparação.

Citometria de Fluxo

Está técnica permite avaliar características físico-químicas das células utilizando anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos que emitem os sinais gerados pela dispersão de luz em um software específico. Este software é responsável por coletar e converter a fluorescência gerada por pulsos eletrônicos e apresentar e avaliar os dados coletados. (SILVA, Ana Paula Santos França da. CABRAL, Guilherme de Souza, 2020).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o surgimento da Leucemia Mieloide Crônica está relacionada com fatores genéticos, exposição a radiação, poluição ou por alguma falha no sistema imunológico. Portanto, é importante que junto com os critérios morfológicos sejam utilizados a tríade principal para um diagnóstico preciso, sendo eles a citogenética, considerado padrão ouro por ser o único exame que avalia todos os cromossomos, seguido da imunofenotipagem e

genética molecular, para que com a identificação e diferenciação da mutação desta patologia e em qual fase ela se encontra, possa ser determinado a terapêutica e prognóstico adequado para a leucemia.

REFERÊNCIAS

- ANUNCIAÇÃO, Suzana Ferreira Da. ELIAS, Larissa Fernanda Queiroz. GUIMARÃES, Dayanne Cintra. FILHO, João Luiz Neto. SADI, Vera Aparecida. Aspectos Diagnósticos da Leucemia Mieloide Crônica e Detecção de Doença Residual Mínima, 2018. Disponível em: <http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/764> Acesso em: 2, abril de 2021.

- BORTOLHEIRO, Teresa Cristina. CHIATONE, Carlos S. Leucemia Mielóide Crônica: História Natural e Classificação, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/JmqbBTkmz936bZPV8ncdZjN/abstract/?lang=pt> Acesso em: 03 de Junho de 2021.

- CITOMETRIA DE FLUXO. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP, São Paulo, 17 de setembro de 2018. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~imunoicb/?page_id=295> Acesso em: 03 de Junho de 2021.

- CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/Mhz4hVfykwqSmMJNBYcbgTQ/abstract/?lang=pt> Acesso em: 03 de Junho de 2021.

- DUTRA, Robson Azevedo. Et al. A importância do Hemograma no diagnóstico Precoce da Leucemia, 2020. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3529/2138>. Acesso em: 25, outubro de 2021.

- ELIAS, Larissa Fernanda Queiroz. Aspectos Diagnósticos da Leucemia Mieloide Crônica e Detecção de Doença Residual Mínima, 2008. Disponível em: <http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/search/authors/view?firstName=Larissa%20Fernanda%20Queiroz&middleName=&lastName=Elias&affiliation=&country=> Acesso em: 03 de Junho de 2021.

- GOMES, Silvana Elias. Leucemia Mieloide Crônica: Aspecto Clínico e Diagnóstico Laboratorial, 2020. Disponível em: <cienciasnees.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/81.pdf> Acesso em: 27, outubro de 2021.

- HEHLMANN, Rüdiger. Chronic Myeloid Leukemia in 2020, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7544304/#!po=25.2212>. Acesso em: 28 de Março de 2021.

- JAMUR, Valderez Ravaglio. Estudo Citogenético de Pacientes Com Leucemia Mieloide Crônica tratados com Mesilato de imatinibe, 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/10278/Valderez%20Ravaglio%20Jamur.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 03 de Junho de 2021

- LAGO, Camila. PETRONI, Tatiane. Fisiopatologia e diagnósticos da Leucemia Mieloide Crônica. Revista Saúde Uni Toledo, 2017. Disponível em: <http://ojs.toledo.br/index.php/saúde/article/view/2442>. Acesso em: 28 de Março de 2021.

- LEUCEMIA. Instituto Nacional do Câncer, São Paulo, 04 de Março de 2020. Disponível em: <http://ww.inca.gov.br/tipos-de-câncer/leucemia>. Acesso em: 10, Maio de 2021.

- LEUCEMIA. Pfizer, São Paulo, 20 de Julho de 2020. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/sua-saúde/oncologia/leucemia>. Acesso em: 28, Maio de 2021.

- MONTENEGRO, Valéria da S. et al. Análise Citogenética na Leucemia Mieloide Crônica, 2018. Disponível em: <revistas.pucsp.br/article>. Acessado em: 27, outubro de 2021.

- REVISTA, Associação Médica Brasileira. Leucemia Mieloide crônica, 2013. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ramb/a/57zDXLmmTwMGWtFHHYD3vHy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 25, outubro de 2021.

- SILVA, Ana Paula Santos França da. CABRAL, Guilherme de Souza. Abordagem sobre as Leucemias e o Papel da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo no Diagnóstico Diferencial, 2020. Disponível em: <http://rdu.unicesumar.edu.br/handle/123456789/7346>. Acesso em 27, outubro de 2021.

- SOSSELA, Fernanda. ZOPPAS, Barbara. WEBER, Lilian. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnósticos e principais alterações observadas no hemograma. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2017. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/leucemia-mieloide-cronica-aspectos-clinicos-diagnostico-e-principais-alteracoes-observadas-no-hemograma/>. Acesso em: 2, Abril de 2021.

- WEINSCHENKER BOLLMANN, Patrícia. Leucemia Mieloide Crônica: passado, presente e futuro. Einstein, 2016. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/eins/v9n2/pt_1679-4508-eins-9-2-0236.pdf>. Acesso em: 12, abril de 2021.