

Bibliografia da Imagem da Capa:

Imagem retirada de:

<http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2012/08/Filadelfia.jpg>

Diana Virgínia Cardoso Leandro

Citogenética e Cancro - Importância do Cromossoma Filadélfia no Diagnóstico e Terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Virgínia Cardoso Leandro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2010114952, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os direitos de autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014

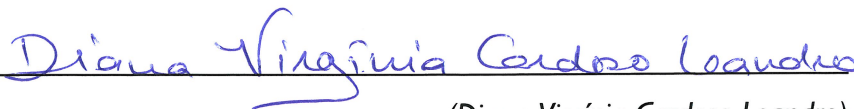
Assinatura

A Tutora

A handwritten signature in blue ink, reading "Celeste Lopes", written over a horizontal line.

(Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes)

A Aluna

A handwritten signature in blue ink, reading "Diana Virgínia Cardoso Leandro", written over a horizontal line.

(Diana Virgínia Cardoso Leandro)

Agradecimentos

A realização desta Monografia, apesar de ter caráter individual, só foi possível graças ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de dedicar algumas palavras sinceras de agradecimento:

À Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes por toda a disponibilidade, atenção e orientação prestadas na elaboração desta monografia;

À Professora Doutora Joana Barbosa de Melo por permitir a assistência às aulas de Genética Humana, bem como pela disponibilidade demonstrada para o esclarecimento de dúvidas;

À Professora Doutora Isabel Carreira por permitir, também, frequentar as aulas de Genética Humana;

Ao meu namorado, Tiago, por tudo o que significa na minha vida e por ser uma fonte de motivação constante e apoio a todos os níveis;

Aos meus pais por estarem sempre presentes e permitirem que o meu percurso fosse um mundo de oportunidades;

À minha irmã por me apoiar durante esta caminhada;

Aos meus amigos por tornarem este meu percurso ainda com mais encanto, preenchendo-o de momentos inesquecíveis.

Resumo

A grande maioria das células cancerosas adquire anomalias cromossômicas clonais, sendo que, muitas delas estão associadas, particularmente, a tipos de tumores específicos, com características morfológicas e clínicas de doença distintas. O cromossoma Filadélfia é um excelente exemplo disso.

O cromossoma Filadélfia resulta de uma translocação recíproca de DNA entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22 [t(9;22)(q34;q11)], originando uma justaposição molecular de dois genes, *BCR* e *ABL*, que formam um gene de fusão *BCR-ABL* no cromossoma 22.

O gene *BCR-ABL* desempenha um papel crítico, essencialmente, na patogênese da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e da Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossoma Filadélfia-Positivo (LLA-Ph⁺). A proteína quimérica *BCR-ABL*, resultante da transcrição do gene, tem atividade tirosinacinase constitutivamente aumentada. Esta ativação enzimática anormal é crítica para o potencial oncogênico da *BCR-ABL*.

A citogenética convencional, a molecular, bem como outras técnicas moleculares são metodologias importantes para o acompanhamento clínico destes doentes, ajudando a estabelecer um diagnóstico correto, a fazer prognósticos, assim como, na seleção e monitorização do tratamento mais adequado para estas patologias e para cada um destes doentes em particular. Com o contributo destas técnicas, a deteção deste rearranjo cromossômico e o reconhecimento das consequências a ele associadas foram cruciais na identificação de alvos terapêuticos para estas doenças. Neste seguimento, surgiram os Inibidores da Tirosina Cinase que revolucionaram o tratamento destas patologias.

O objetivo desta monografia é demonstrar, através da informação da literatura científica, a importância do cromossoma Filadélfia no diagnóstico e terapêutica das respetivas doenças relacionadas. Para isso, será feita uma caracterização alargada deste cromossoma, seguida de uma breve descrição das patologias a ele associadas, bem como, das abordagens terapêuticas possíveis para estas doenças. Finalmente, explicar-se-á quais os ensaios laboratoriais mais importantes no diagnóstico e monitorização da terapêutica. Para uma melhor compreensão do tema, será feita uma pequena introdução, que integra conceitos gerais sobre o cancro, relacionando-os com a citogenética.

Palavras-chave: cromossoma Filadélfia, gene *BCR-ABL*, proteína quimérica *BCR-ABL*, Leucemia Mielóide Crônica, Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossoma Filadélfia-Positivo, citogenética, inibidores da tirosina cinase, cancro.

Abstract

Most cancer cells acquire clonal chromosomal abnormalities, a large portion of them are associated, particularly, to specific types of tumors, with distinct clinical and morphological disease characteristics. The Philadelphia chromosome is a great example of that.

The Philadelphia chromosome is a result of a reciprocal translocation of DNA between the long arm of chromosome 9 and the long arm of chromosome 22 [t(9;22)(q34;q11)], resulting in the molecular juxtaposition of two genes, *BCR* and *ABL*, which forms the fusion gene *BCR-ABL* on the chromosome 22.

The gene *BCR-ABL* plays a critical role, essentially, in the pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph⁺-ALL). The chimeric protein BCR-ABL, resulting from the transcription of the gene, has a constitutively augmented tyrosine kinase activity. This abnormal enzymatic activation is critical to the oncogenic potential of BCR-ABL.

The conventional cytogenetics, molecular, as well as other molecular techniques are important tools in the clinical management of these patients, helping establish a correct diagnosis, making prognosis, and in selecting and monitoring the most adequate treatment for these pathologies and particularly for each of the patients. With the contribution of these techniques, the detection of this chromosome rearrangement and the recognition of its associated consequences were crucial in the identification of therapeutic targets for these diseases. Following this, the tyrosine kinase inhibitors have emerged, revolutionizing the treatment of these pathologies.

The purpose of this monograph is to demonstrate, through the information of scientific literature, the importance of the Philadelphia chromosome in the diagnosis and therapeutics of the respective diseases related. To understand this importance we did a comprehensive characterization of this chromosome, followed by a brief description of the pathologies associated with it, as well as the possible therapeutic approaches for these diseases. Finally, an elucidation of the most important laboratory assays for diagnostic and monitoring the therapeutic will be made. For a better understanding of the subject, a brief introduction will be made featuring general concepts about cancer, relating them with cytogenetics.

Key words: Philadelphia chromosome, *BCR-ABL* gene, BCR-ABL chimeric protein, Chronic Myeloid Leukemia, Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia, cytogenetics, tyrosine kinase inhibitors, cancer.

Índice

Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução.....	9
2. O Cromossoma Filadélfia (Ph)	11
2.1. Doenças Cromossoma Filadélfia-Positivo (Ph+)	11
2.1.1. Leucemia Mielóide Crónica (LMC).....	12
2.1.2. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	13
2.2. Caracterização Citogenética e Molecular do Cromossoma Filadélfia.....	14
3. Abordagens Terapêuticas	19
3.1. Tratamento da Leucemia Mielóide Crónica (LMC)	19
3.2. Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda Ph ⁺ (LLA-Ph ⁺).....	20
3.3. Mecanismos de Resistência à Terapêutica	22
4. Ensaios Laboratoriais para Diagnóstico e Monitorização da Terapêutica.....	23
4.1. Diagnóstico	24
4.2. Monitorização da Terapêutica	25
5. Conclusão	28
6. Referências Bibliográficas.....	29
ANEXOS	32

Lista de Abreviaturas

ABL – Abelson Leukemia gene

alloHSCT – allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Array-CGH – Hibridização Genômica Comparativa baseada em Array

ATP – Adenosina Trifosfato

BCR – Breakpoint cluster region

CB – Fase de Crise Blástica

CCyR – Complete Cytogenetic Response

CHR – Complete Hematological Response

CIR – Condicionamento de Intensidade Reduzida

CMoR – Complete Molecular Response

DRM – Doença Residual Mínima

EMA – European Medicines Agency

FA – Fase Acelerada

FC – Fase Crônica

FDA – Food and Drug Administration

FISH – Hibridização In Situ de Fluorescência

GDP – Guanosina Di-fosfato

GEF – Guanine Nucleotide Exchange factor

GTP – Guanosina Tri-fosfato

HLA – Human Leukocyte Antigen

IM – Imatinib

INF- α – Interferão-alfa

ITC – Inibidores da Tirosina Cinase

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LLA-Ph⁺ – Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossoma Filadélfia-Positivo

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

M-bcr – Major breakpoint cluster region

m-bcr – minor breakpoint cluster region

M-FISH – Hibridização In Situ de Fluorescência Multicolor

mRNA – RNA mensageiro

NF- κ B – nuclear factor kappa B

PDGFR – Platelet-derived growth factor receptor

Ph – Cromossoma Filadélfia

Ph⁻ – Cromossoma Filadélfia Negativo

Ph⁺ – Cromossoma Filadélfia Positivo

RC – Remissão Completa

RQ-PCR – *Real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction*

RT-PCR – *Reverse-transcription polymerase chain reaction*

SH – Domínios Homólogos Src (*Src-homology*)

SP – Sangue Periférico

μ-bcr – *micro breakpoint cluster region*

I. Introdução

Todos os dias, milhares de pessoas são diagnosticadas com cancro¹, pelo que uma investigação constante revela-se uma necessidade imprescindível, numa área de intervenção tão importante como esta.

Sendo o cancro uma doença invariavelmente fatal, caso não seja tratada, o seu diagnóstico precoce e o tratamento imediato assumem papéis fundamentais no acompanhamento clínico destes doentes, bem como a identificação de pessoas com risco aumentado de desenvolvimento de cancro antes do seu aparecimento².

As neoplasias, sejam elas esporádicas ou hereditárias, têm origem genética, na medida em que resultam de alterações mais ou menos complexas e sucessivas da informação presente no genoma de uma determinada célula. Estas modificações conferem características exclusivas e vantajosas à célula neoplásica, afetando mecanismos de regulação da proliferação celular, da apoptose ou da senescência celular³. Por isto, é importante fazer, também, uma distinção entre o que é o cancro e a neoplasia. O cancro é o termo utilizado para descrever formas “mais virulentas” de neoplasia, um processo de doença caracterizado por proliferação celular relativamente descontrolada, que conduz a uma massa tumoral ou (neoplasma). Contudo, para um neoplasma ser um cancro, este deve ser maligno², isto é, já múltiplas e complexas alterações/mutações genéticas e cromossómicas se desencadearam, podendo ser, na maioria dos casos, identificadas⁴. Neste caso, o crescimento do tumor deixa de ser controlado e, conseqüentemente, este passa a progredir, invadindo os tecidos adjacentes, podendo espalhar-se (criando metástase) para outros tecidos do organismo. Por outro lado, os tumores que não invadem, nem metastizam² (normalmente exibem anormalidades cromossómicas mais simples)⁴ não são cancerosos, e são referidos, habitualmente, como tumores benignos, embora o seu tamanho e localização possam torná-los tudo, menos benignos, para o doente².

Os rearranjos cromossómicos, designadamente, translocações, deleções, inversões e inserções, são modificações genéticas frequentes no cancro⁵. No entanto, os rearranjos equilibrados, isto é, alterações estruturais que levam à deslocalização de segmentos cromossómicos sem ganho ou perda de material genético, das quais podemos destacar, translocações recíprocas (troca de material cromossómico entre dois ou mais cromossomas) e inversões (rotação de 180° de um segmento cromossómico), são alterações, particularmente, associadas a tipos de tumores específicos, com características morfológicas e clínicas de doença distintas⁴.

Em 1970, a descoberta e introdução da técnica citogenética de bandeamento cromossômico, e mais tarde, com os avanços tecnológicos, das técnicas moleculares citogenéticas como, a hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), a multicolor FISH (M-FISH) e a hibridização genômica comparativa baseada em *array* (*array*-CGH), em simultâneo, com o rápido progresso noutras áreas da biologia celular e tumoral, revolucionaram a citogenética do cancro, aumentando, significativamente, o nosso conhecimento e compreensão dos mecanismos moleculares que operam na iniciação e progressão neoplásica. Estas novas metodologias permitiram aos cientistas investigar células tumorais, ao nível de genes específicos e mesmo ao nível de simples pares de bases, desvendando, assim, consequências moleculares de um número cada vez maior de aberrações cromossômicas associadas ao cancro⁶.

A citogenética e os estudos moleculares citogenéticos têm demonstrado que o desenvolvimento do tumor é o resultado de um processo com múltiplos estádios e que as células neoplásicas são caracterizadas por aberrações cromossômicas não aleatórias associadas a tipos de tumores particulares e, em certos casos, com elevada especificidade⁴. Apesar desta não aleatoriedade, muitas vezes, várias alterações estão presentes, simultaneamente. A razão para este fenómeno acontecer é que as células neoplásicas, em contraste com as células normais, são caracterizadas por uma evolução cromossômica contínua, uma adaptação Darwiniana a um microambiente variável comparável à evolução natural nos organismos vivos, em que há aquisição e, muitas vezes, acumulação de novas alterações genéticas, refletindo o balanço entre mutação e seleção, isto é, a sobrevivência do mais apto a nível celular. Como consequência desta evolução clonal, as aberrações cromossômicas encontradas na neoplasia podem ser, fundamentalmente, de dois tipos: primárias e secundárias^{4,6}. As alterações cromossômicas primárias ocorrem nas fases precoces do desenvolvimento do tumor, estão geralmente ligadas à sua génese, são habitualmente únicas e associam-se de uma forma específica a um determinado tipo de tumor, como etapa essencial do seu desenvolvimento. As alterações cromossômicas secundárias são observadas numa fase mais tardia do desenvolvimento do tumor, são frequentemente múltiplas e coexistem com as alterações primárias já presentes. Estas não ocorrem ao acaso, podendo mesmo estar relacionadas com o comportamento biológico do tumor, em termos de capacidade invasiva, de metastização e de resposta à terapêutica³.

A compreensão dos mecanismos responsáveis pela formação destes rearranjos cromossômicos recorrentes e das suas funções biológicas, tem levado ao desenvolvimento de novos regimes terapêuticos direcionados, especificamente, para as células tumorais alvo, com um impacto mínimo nas células normais⁵.

Ao longo desta monografia, será apresentado um tipo de rearranjo específico que origina uma sequência híbrida, *BCR-ABL*, que codifica uma proteína quimérica com atividade tirosinacinaase aumentada. Este rearranjo específico, também conhecido como Cromossoma Filadélfia (Ph), tem inúmeras implicações na gênese de diferentes patologias e, subsequentemente, implicações a nível dos respetivos diagnósticos e abordagens terapêuticas, pelo que estes temas serão aqui discutidos.

2. O Cromossoma Filadélfia (Ph)

A descoberta, em 1960, do cromossoma Ph, por Nowell e Hungerford, em doentes com Leucemia Mielóide Crónica (LMC), permitiu estabelecer a primeira relação causal entre uma mutação cromossómica específica e uma neoplasia. Este marco tornou a LMC um modelo de estudo do cancro e impulsionou, conseqüentemente, a identificação e associação de inúmeras aberrações cromossómicas a neoplasias⁷. O cromossoma Ph é, essencialmente, um cromossoma 22 encurtado que resulta de uma translocação recíproca de DNA entre o braço longo do cromossoma 9 e o braço longo do cromossoma 22 $t(9;22)(q34;q11)$ ⁸. Esta identificação foi possível através de técnicas de bandeamento, por marcação dos cromossomas com quinacrina fluorescente e Giemsa⁷. No entanto, o mecanismo que despoleta a translocação entre os dois cromossomas permanece ainda desconhecido⁸. A translocação ocorre entre o proto-oncogene *ABL* (*Abelson Leukemia Gene*), no cromossoma 9, e o gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), no cromossoma 22, levando à produção de um oncogene de fusão *BCR-ABL*, que codifica uma oncoproteína quimérica (*BCR-ABL*), com atividade tirosinacinaase constitutiva. A proteína *BCR-ABL* é capaz de transformar células através da fosforilação em resíduos de tirosina numa variedade de proteínas intermediárias, envolvidas na transdução do sinal, desencadeando, assim, ativação de cascatas de sinalização que originam a formação de diferentes neoplasias⁹, dependendo do tipo de célula afetada e da proteína de fusão, *BCR-ABL*, resultante⁸.

2.1. Doenças Cromossoma Filadélfia-Positivo (Ph+)

A “doença cromossoma Filadélfia-positivo” é caracterizada por uma heterogeneidade fenotípica, na medida em que, o cromossoma Filadélfia, por si só, não é suficientemente específico no diagnóstico diferencial das diferentes patologias a ele associadas. É necessário ter em conta diferentes características clínicas e parâmetros biológicos, como por exemplo, o tipo de células afetadas, a proteína de fusão *BCR-ABL* resultante, entre outras.

Seguidamente, serão expostas as patologias mais comuns associadas ao cromossoma Filadélfia^{7,8}.

2.1.1. Leucemia Mielóide Crónica (LMC)

A literatura indica que a presença do cromossoma Filadélfia é responsável pela etiologia da LMC, em 95% dos casos¹⁰. A LMC é uma doença clonal mieloproliferativa, isto é, caracteriza-se, essencialmente, pela proliferação descontrolada de leucócitos da linhagem mielóide (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos e monócitos). Apesar da expansão desregulada da linhagem mielóide ser o fenótipo patológico característico da LMC, estudos citogenéticos demonstram que cerca de 20% dos doentes em CB (Fase de Crise Blástica) apresentam também um fenótipo linfoblástico. Esta observação corrobora a origem estaminal clonal da LMC, confirmando que a transformação neoplásica que dá origem ao cromossoma Ph ocorre nas células primitivas estaminais hematopoiéticas que ainda não se encontram “comprometidas”, quer com a diferenciação mielóide, quer com a linfóide¹¹. A incidência da LMC, a nível mundial é, aproximadamente, de 1-2 casos em 100000 pessoas por ano, representando cerca de 15% das leucemias no adulto. Esta ocorre em todos os grupos etários, embora seja mais frequente no adulto homem¹².

A evolução natural da LMC envolve três fases, que se distinguem através de características clínicas e achados laboratoriais (Figura 1). Em geral, começa com a Fase Crónica (FC) (característica em 85% dos doentes recém-diagnosticados). Passados vários anos, progride para a Fase Acelerada (FA) e, finalmente, para a Fase de Crise Blástica (CB)¹⁰. A duração da FC é variável e depende do diagnóstico precoce, assim como da terapêutica utilizada. Na ausência de um tratamento eficaz, a doença evolui, em poucos anos, para a FA¹¹. A CB, que é a fase terminal, apresenta um comportamento clínico semelhante ao da leucemia aguda, com rápida progressão e sobrevivência curta. O mecanismo responsável pela progressão da FC para a FA e, seguidamente, para a CB é complexo e ainda não é bem compreendido. Este pode ser, em parte, explicado pela formação de novas anomalias cromossómicas (adicionais ao Cromossoma Filadélfia), que podem originar regulação positiva de genes responsáveis pela inibição da diferenciação, instabilidade genómica e/ou inativação de genes supressores de tumores¹⁰.

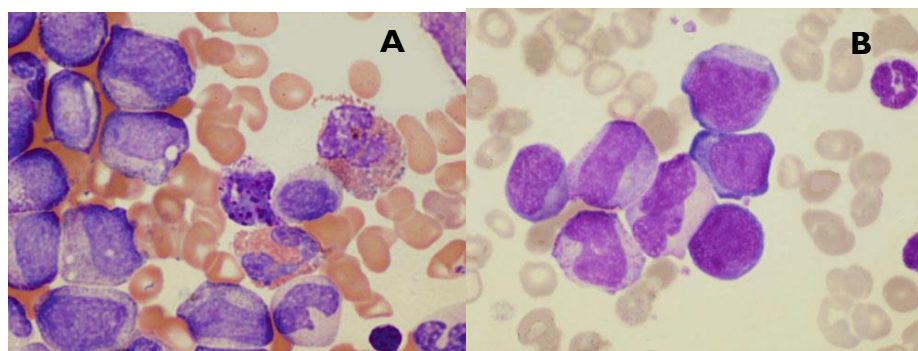


Figura 1 – **A:** Esfregaço de sangue periférico de um doente com LMC, com contagem de leucócitos anormalmente elevado, mostrando um aumento de neutrófilos, eosinófilos, basófilos e precursores de granulócitos. **B:** Esfregaço de sangue periférico de um doente com LMC em CB, mostrando três células blásticas, precursores de granulócitos, e várias células displásicas da linha dos neutrófilos. (Figura retirada de: BAIN, B. – Pathology of the Chronic Myeloid Leukemias. In: WIERNIK, P. et al. – Neoplastic Diseases of the Blood. 5ªEd. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-3763-5, p. 19-28)¹¹.

2.1.2. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é caracterizada por um crescimento descontrolado de células da linhagem linfóide imaturas (linfoblastos), essencialmente, na medula óssea, sangue e órgãos linfóides assim como por pancitopenia⁸. É uma doença biologicamente heterogênea, pelo que os estudos a nível morfológico, imunológico, citogenético e molecular, nas amostras biológicas destes doentes são, particularmente, necessários para estabelecer o diagnóstico correto, bem como para excluir outras causas possíveis da insuficiência da medula óssea e para classificação dos subtipos de LLA. Esta heterogeneidade reflete o facto de a leucemia poder ocorrer em qualquer momento, durante as várias fases de diferenciação linfóide normal¹³.

Apesar do cromossoma Ph ser responsável pela etiologia de cerca de 95% dos casos de LMC, em 30% dos adultos com LLA e em cerca de 3% a 5% de todos os casos pediátricos (<20 anos), este também pode ser observado¹⁴, sendo a anomalia citogenética mais comum associada à LLA no adulto¹⁵. Clinicamente, em relação aos doentes Ph⁻, os doentes com Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossoma Filadélfia-Positivo (ALL-Ph⁺), em geral, são mais velhos, têm uma contagem de leucócitos mais elevada, assim como maior percentagem de blastos circulantes e muita frequência da morfologia FAB L2 (categoria de linfoblastos identificada pelo Grupo de Trabalho Cooperativo Franco-Américo-Britânico – FAB) (Figura 2). A maioria dos blastos Ph⁺ têm um imunofenótipo da linhagem B, embora, em menor frequência, possa aparecer um imunofenótipo da linhagem T ou um imunofenótipo misto (linhagem B e T)¹⁴.

Para estes doentes, a idade é um importante determinante de prognóstico e de resultados ao tratamento. As taxas de sobrevivência a longo prazo (>3 anos) vão diminuindo com o avançar da idade, sendo aproximadamente cerca de 30% nos adultos entre os 45 e 54 anos. A mudança de prognóstico que vai ocorrendo com o avançar da idade pode ser atribuída, em parte, à suscetibilidade de ocorrência de anomalias citogenéticas desfavoráveis associadas à idade. Até recentemente, doentes com LLA-Ph⁺ tinham um prognóstico bastante reservado, tanto as crianças como os adultos, devido à rápida progressão da doença, face às abordagens terapêuticas disponíveis. Com a introdução dos Inibidores da Tirosina Cinase (ITC) na terapêutica da LLA-Ph⁺, o prognóstico destes doentes melhorou significativamente¹⁵, contudo, este assunto será discutido com maior pormenor no ponto 3 desta monografia.

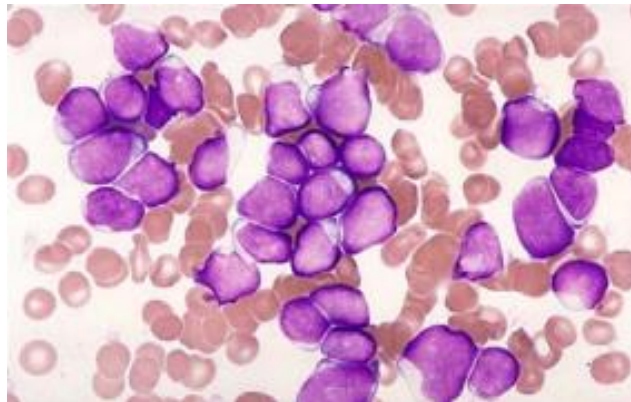


Figura 2 – Linfoblastos FAB L2, caracterizados pela presença de linfoblastos grandes, com um núcleo bastante aumentado em relação ao volume de citoplasma, presença de nucléolos proeminentes, muitas vezes com condensação da cromatina perinuclear, e a membrana nuclear pode ser irregular ou em forma de rim. (Figura retirada de: CONTER, V. et al. – Acute Lymphoblastic Leukemia. Orphanet Encyclopedia, 2004)¹⁴.

2.2. Caracterização Citogenética e Molecular do Cromossoma Filadélfia

A verdadeira natureza do cromossoma Ph, aquando da sua descoberta em 1960 (tal como referido acima), era desconhecida. Só mais tarde, por volta de 1970, com o advento de várias técnicas de bandeamento cromossómico, foi possível verificar que este era o resultado de uma translocação equilibrada recíproca entre segmentos de DNA situados nos braços longos do cromossoma 9 e 22 $t(9;22)(q34;q11)$. A nível citogenético, o cromossoma Ph consiste num cromossoma 22 de menores dimensões, em resultado da translocação recíproca referida (Figura 3)¹⁶.

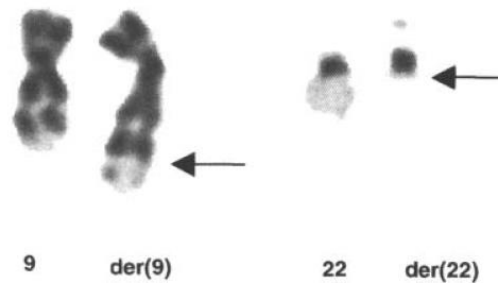


Figura 3 – Cariótipo parcial mostrando a translocação $t(9;22)(q34;q11)$. As setas indicam o ponto de quebra nos cromossomas derivados. (Figura retirada de: FIORETOS, T.; JOHANSSON, B. – Chronic Myeloid Leukemia. In: Cancer Cytogenetics. 3ªEd. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-18179-9 p.179-207)¹⁶.

Como consequência desta anomalia genética forma-se um gene de fusão *BCR-ABL* (Figura 4), que a nível molecular se traduz na justaposição de sequências 3' do proto-oncogene *ABL* no cromossoma 9, com sequências 5' do gene *BCR* no cromossoma 22. Consoante os pontos de quebra dentro dos genes *ABL* e *BCR*, a proteína quimérica *BCR-ABL* pode ter diferentes pesos moleculares e estar associada a diferentes formas de leucemia¹⁷.

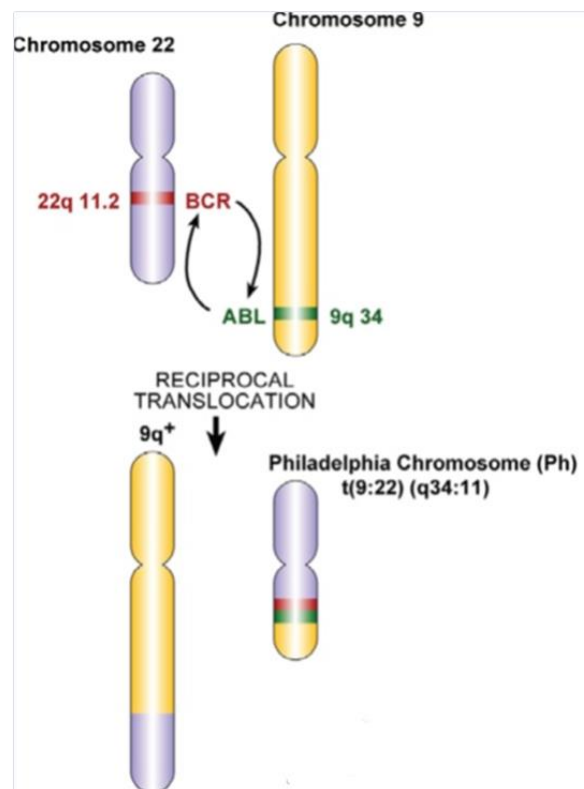


Figura 4 – Esquema adaptado da Formação do Cromossoma Filadélfia como resultado da $t(9;22)(q34;q11)$ (Figura adaptada de: FRAZER, R., et al. – Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st Century. The Ulster Med. J., 76, 1 (2007) 8-17)¹⁷.

O gene *ABL*, (*Abelson leukemia gene*), consiste em 11 exões, sendo que o primeiro possui dois exões alternativos, Ia e Ib. Este gene abrange cerca de 230 kb na região q34 do cromossoma 9 e codifica a proteína cinase *ABL*⁷, que apresenta um peso molecular de 145 kDa⁸. Esta proteína está envolvida em diversos mecanismos de regulação da homeostase celular, entre eles evidenciam-se a regulação do ciclo celular, a resposta ao stress genotóxico e a transmissão de informação proveniente do microambiente celular¹⁸. Esta proteína apresenta, ainda, duas isoformas possíveis, estando uma no núcleo (envolvida em processos de regulação do ciclo celular e genotoxicidade) e outra no citoplasma (envolvida em processos de sinalização e dinâmica do citoesqueleto)⁸, interagindo de forma complexa com outras proteínas celulares. Estruturalmente, a proteína *ABL* para além do domínio tirosina cinase (domínio homólogo Src I - SH1), apresenta domínios SH2 e SH3 (envolvidos na auto-regulação da atividade cinase)¹⁸ e um local de miristoilação que permite a associação desta proteína com outras proteínas da membrana. A zona central e o terminal carboxílico são locais de ligação a diferentes estruturas, como ao DNA e à actina (Figura 5).

As tirosina cinases, sendo enzimas que adicionam grupos fosfato a um resíduo de tirosina, têm um domínio catalítico que promove a transferência de um grupo fosforil terminal da adenosina trifosfato (ATP), para um grupo amina do substrato tirosina na proteína recetora. Em condições normais, a fosforilação pela proteína *ABL* está muito bem controlada, provavelmente por sequências da região N-terminal, pelo que a perda desta região (como ocorre na formação da proteína *BCR-ABL*) resulta numa elevada atividade cinase constitutiva, o que é um fator chave no potencial oncogénico de proteínas *ABL* transformadas^{8,19}. Os pontos de quebra dentro do gene *ABL* podem ocorrer na extremidade 5' a montante do 1º exão alternativo Ib, a jusante do 2º exão alternativo Ia ou, mais frequentemente, entre os dois exões (Figura 6). Independentemente do local de quebra dentro do gene, após o *splicing* do transcrito primário, os exões de ligação à sequência *BCR* são o $\alpha 2$ (na maioria dos casos) ou o $\alpha 3$. O motivo pelo qual os primeiros exões do gene *ABL* não integram o oncogene de fusão ainda não foi descrito^{7,19}.

O gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) está situado no braço longo do cromossoma 22 (22q11) e é traduzido em duas proteínas maioritárias que têm pesos moleculares de 160 kDa e 130 kDa. A proteína *BCR* normal reside tanto no núcleo como no citoplasma, sendo que no núcleo encontra-se associada ao DNA condensado, tanto na interfase como na metafase. O gene *BCR* é constituído por vários domínios funcionais e está implicado, maioritariamente, em duas vias de sinalização celular (fosforilação e ligação à guanosina trifosfato [GTP])⁸. No terminal amínico (N), encontra-se um domínio que permite a dimerização e outro que confere a atividade serina-treonina cinase. A parte central do gene

codifica um fator de troca de guaninas (de GTP para GDP), o GEF - *Guanine nucleotide exchange factor*, cuja função é mediar a ativação da Rho, uma proteína envolvida na ativação de fatores de transcrição, como o NF-κB. O terminal carboxílico (C) codifica uma GTPase com actividade na proteína Rac (GTPase da superfamília Ras), que por sua vez se encontra envolvida na regulação da polimerização da actina e da atividade da NADPH oxidase das células fagocíticas¹⁹ (Figura 5).

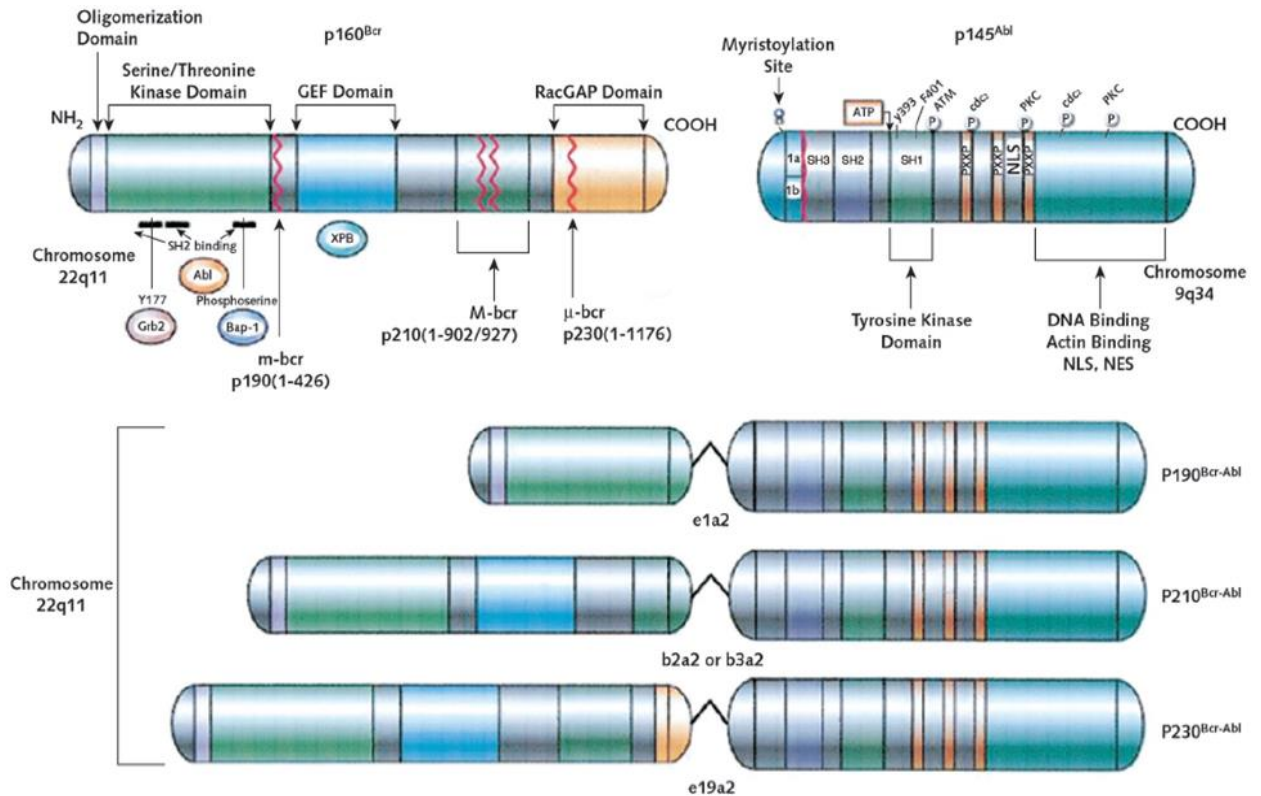


Figura 5 – Proteínas BCR e ABL normais e possíveis proteínas de fusão BCR-ABL resultantes da translocação (Figura retirada de: KANTARJIAN, H. et al. – Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. Ann. Intern. Med, 138, 10 (2003) 819-830)⁸.

Dentro do gene *BCR* os pontos de quebra podem ocorrer na *Major breakpoint cluster region* (M-bcr), na *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) e na *micro breakpoint cluster region* (μ -bcr) (Figura 6), sendo que, são essencialmente os locais de quebra dentro do gene *BCR* e o local de inserção do gene *ABL*, que determinam os diferentes transcritos de mRNA do gene *BCR-ABL*, resultante da translocação referida acima^{7,8}. Quando a quebra ocorre na M-bcr, a sequência do transcrito *BCR-ABL* resultante pode ser tanto b2a2 como b3a2, em resultado do *splicing* alternativo. Ambos os transcritos são traduzidos na proteína quimérica BCR-ABL com peso molecular de 210 kDa, denominada de p210^{BCR-ABL}, que é a forma mais comum da proteína, estando presente em cerca 99% dos doentes com LMC, em cerca de 30% a 50% dos adultos com LLA-Ph⁺ e em cerca de 15% das crianças com LLA-Ph⁺^{7,10,20}. Outra proteína que resulta da fusão dos dois genes é a proteína p190^{BCR-ABL}, com peso

molecular de 190 kDa, em que o ponto de quebra no gene *BCR* ocorre na *m-bcr*, resultando num transcrito *e1a2*, que corresponde a uma proteína BCR-ABL mais pequena. Esta encontra-se, com maior frequência, em doentes com LLA-Ph⁺, nomeadamente em 50% a 70% dos casos de adultos e em 80% das crianças⁷. Os transcritos *e1a2* podem estar presentes, embora mais raramente, em menos de 1% dos doentes com LMC¹⁰. O terceiro, e o mais raro transcrito, é o *e19a2* que tem origem na inserção entre os exões 19 e 20, localizados na *micro breakpoint cluster region* (μ -*bcr*). Deste transcrito resulta uma proteína com 230 kDa (p230^{BCR-ABL}), que normalmente está associada a casos de Leucemia Neutrófila Crónica^{8,10} (Figura 5).

Em termos funcionais, as diferentes oncoproteínas, derivadas do gene de fusão, apresentam atividade de tirosina cinase desregulada e agressividade distinta. Atualmente, não se sabe como é que estas diferem umas das outras em termos de sinalização, mas as alterações genéticas adicionais parecem ser necessárias para a progressão da doença. Tem sido demonstrado também que o comprimento da proteína de fusão se correlaciona com a agressividade da doença. Assim, a forma menos agressiva corresponde ao transcrito p230^{BCR-ABL}, seguido da proteína p210^{BCR-ABL}, correspondendo o transcrito p190^{BCR-ABL} à forma mais agressiva. Deste modo, podemos afirmar que quanto maior o conteúdo de BCR translocado, menor a agressividade da patologia associada²¹.

Após a identificação da atividade constitutiva tirosinacinaze da proteína BCR-ABL, nos diferentes transcritos, desenvolveram-se novas estratégias terapêuticas para as patologias associadas a esta anomalia genética que serão abordadas no próximo capítulo.

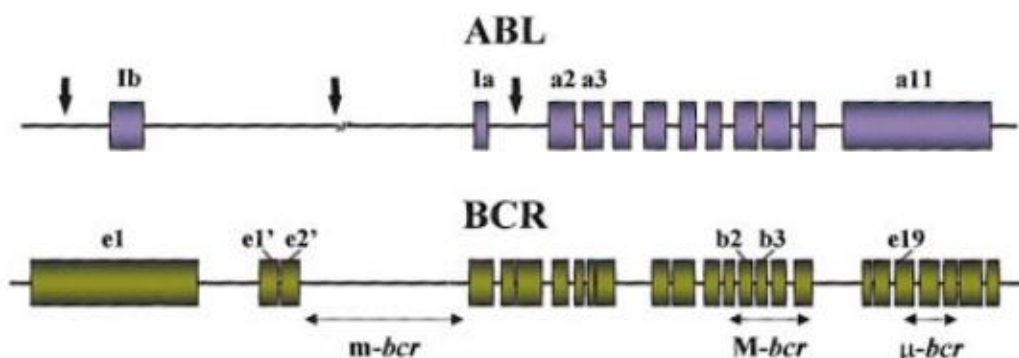


Figura 6 – Imagem adaptada da localização dos pontos de quebra nos genes *ABL* e *BCR* (Imagem adaptada de: DEININGER, M., et al. – The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 94, 10 (2000) 3343-3356)¹⁹.

3. Abordagens Terapêuticas

3.1. Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

Durante muitos anos, a estratégia de tratamento dos doentes com LMC era baseada em agentes quimioterapêuticos, no entanto, estes apenas forneciam manutenção clínica, falhando na eliminação de clones malignos, isto é, havia normalização da contagem de células do sangue, mas a terapêutica falhava na eliminação das células da medula óssea que continham o cromossoma Ph⁺, não havendo alteração do percurso natural da doença, apesar de alguns benefícios clínicos^{10,20}. Mais tarde, em meados de 1970, um grupo de investigadores reportou o desaparecimento de clones Ph⁺ em doentes tratados com transplante alogénico de células progenitoras hematopoiéticas (alloHSCT – *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*)¹⁰, sendo que, ainda hoje, continua a ser reconhecido como terapêutica curativa exclusiva na LMC. Contudo, tem vindo a ser progressivamente abandonado como terapêutica de primeira linha¹², uma vez que comporta um risco significativo de mortalidade. A idade, o estado e a duração da doença, as combinações de género e o grau de histocompatibilidade entre o dador e o recetor, a fonte do produto de transplante, bem como, o tratamento prévio (mieloablação) com agentes radioquimioterapêuticos foram identificados como fatores determinantes da sobrevivência a longo prazo destes doentes submetidos ao alloHSCT¹⁷. No entanto, a sua indicação mantém-se nos casos em que ocorre resposta insatisfatória à terapêutica com os Inibidores da Tirosina Cinase (ITC), que serão abordados seguidamente, ou quando se desenvolvem mutações resistentes aos ITC¹².

O reconhecimento da importância da desregulação da atividade tirosinacinaase da proteína de fusão BCR-ABL na patogenia da LMC, levou ao desenvolvimento de novos fármacos inibidores desta ação, permitindo controlar a progressão da doença para as fases subsequentes. O aparecimento dos ITC, nos finais de 1990, revolucionou a terapêutica da LMC, tornando-se, na maioria dos casos, a terapêutica de primeira linha nesta patologia. Os progressos observados com este grupo terapêutico e, em particular, com o Imatinib, traduzem-se num aumento marcado da sobrevivência global, tolerabilidade e qualidade de vida dos doentes, comparativamente a outras opções terapêuticas^{10,12}.

Atualmente, têm sido utilizados, como opções terapêuticas de primeira linha, nos doentes recém-diagnosticados, três ITC, designadamente, o mesilato de imatinib (Glivec[®]), o dasatinib (Sprycel[®]) e o nilotinib (Tasigna[®])⁵. O imatinib (IM) foi o primeiro fármaco, deste grupo, a ser aprovado pela FDA e a EMA, em 2001, no tratamento de doentes com LMC¹⁷. Este fármaco é um derivado da 2-fenilaminopirimidina e funciona como um inibidor específico de uma quantidade de enzimas com atividade tirosinacinaase, nomeadamente, a

BCR-ABL, a ABL, a c-kit e o PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*). Focando-nos na proteína BCR-ABL, o IM, tal como os outros ITC, inibem a fosforilação desta, no sítio de ligação do ATP, bloqueando assim a transdução do sinal a jusante, isto é, levando à inibição da atividade constitutiva tirosinacina da proteína^{10,17}. No entanto, cerca de 30% dos doentes não respondiam ou tornavam-se resistentes ao IM, pelo que outros ITC, mais potentes, foram disponibilizados, no sentido de contornar estas limitações. Em diversos estudos, tanto o dasatinib como o nilotinib, que são ITC de segunda geração e, portanto, mais potentes, demonstraram induzir respostas moleculares mais eficazes que o IM, sendo utilizados quando a terapêutica com o IM falha. Tal como acontece com o IM, também é possível ocorrer resistência aos ITC de segunda geração. Assim, surge um ITC de terceira geração, o ponatinib⁵ (Iclusing[®]), que está atualmente em fase III dos ensaios clínicos. Num estudo de fase II, este foi testado em doentes com resistência ou intolerância ao dasatinib ou nilotinib e em doentes com uma mutação T315I responsável pela resistência à terapêutica com ITC (no ponto 3.3., este assunto será discutido com maior pormenor). Neste estudo, o ponatinib demonstrou benefícios clínicos, estando associado à obtenção de uma resposta citogenética e hematológica *major*, em mais de metade dos doentes com LMC em fase crónica e promoveu benefícios significativos nos doentes em FA, em CB e em doentes com LLA-Ph⁺, apesar da prévia intolerância ou refratariedade aos outros ITC. Embora a eficácia terapêutica do ponatinib pareça promissora, devem ser pesados os benefícios e os potenciais riscos, antes de iniciar o tratamento, uma vez que este apresenta vários efeitos adversos que podem agravar a situação clínica dos doentes²².

Assim, a utilização dos ITC deve ser efectuada de forma rigorosa, visando a optimização dos resultados. Para tal, é necessária uma correta monitorização da resposta à terapêutica em períodos pré-estabelecidos, que permitam comparações, de modo a decidir com segurança a manutenção ou alteração da dose, a suspensão da terapêutica, a passagem para terapêuticas de segunda geração, ou outras¹².

3.2. Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda Ph⁺ (LLA-Ph⁺)

Até recentemente, os doentes com LLA-Ph⁺ tinham um prognóstico bastante reservado, devido à rápida progressão da doença, face às abordagens terapêuticas disponíveis. Antes do aparecimento dos ITC, estes doentes apresentavam uma fraca resposta à maioria das combinações quimioterapêuticas disponíveis, curtos períodos de remissão e baixas taxas de sobrevivência¹⁵. Com o aparecimento dos ITC, múltiplos ensaios clínicos têm demonstrado, conclusivamente, respostas iniciais marcadamente superiores,

resultando em elevadas taxas de remissão completa (RC), sem toxicidade adicional. Estes estudos têm começado a sugerir, também, que é possível a obtenção de melhores resultados a longo prazo.

Até à data, há pouca ou nenhuma evidência de que o alloHSCT, a base tóxica do tratamento desta patologia, seja ainda (ou se algum dia será) uma parte dispensável da terapia. Por conseguinte, os desafios chave no tratamento da LLA-Ph⁺ são a seleção da terapêutica apropriada pré-transplante, a minimização da toxicidade do alloHSCT, o uso correto dos ITC após o transplante e a utilização apropriada da informação proveniente da monitorização, direcionando a melhor opção terapêutica²³.

O tratamento da LLA-Ph⁺ é altamente complexo e prolongado, e baseia-se, geralmente, na quimioterapia combinada e intensiva em associação com os ITC, seguida de alloHSCT e manutenção da doença residual mínima (DRM) com os ITC¹⁵.

O alloHSCT, tal como referido anteriormente, ainda é considerado a melhor opção terapêutica para os doentes com ALL-Ph⁺ em remissão completa primária, embora resultados a longo prazo possam ser alcançados, utilizando associações de agentes quimioterapêuticos (como a doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina e a dexametasona) com os ITC (imatinib, nilotinib e dasatinib), sugerindo a possibilidade de sobrevivência a longo prazo de doentes que não possam ser submetidos ao alloHSCT. Ao transplante estão associadas elevadas taxas de morbilidade e mortalidade relacionadas com o tratamento, pelo que nem sempre é possível executá-lo. A idade é um preditor muito importante, na indicação do alloHSCT, sendo que em doentes com idade mais avançada, normalmente, este procedimento está contra-indicado. A utilização de regimes de condicionamento de intensidade reduzida (CIR) (não mieloablativos), como preparação para o transplante, estão sob avaliação e têm sido relatados resultados aceitáveis, apresentando menores taxas de mortalidade associadas ao tratamento^{23,24}.

Os ITC têm melhorado significativamente os resultados clínicos dos doentes com LLA-Ph⁺, utilizando como padrão o imatinib em associação com a quimioterapia intensiva (doxorrubicina, vincristina, dexametasona, ciclofosfamida, metotrexato, etc.) no início do tratamento (fase de indução), sendo continuado na fase de manutenção e consolidação da quimioterapia. Os ITC de segunda geração, como o dasatinib e o nilotinib, são mais potentes e produzem normalmente melhores resultados. A monoterapia com ITC deve ser reservada para os idosos e para aqueles incapazes de tolerar a quimioterapia intensiva. A monitorização da doença residual mínima (DRM), que corresponde ao número de células neoplásicas detetáveis durante ou após o tratamento, também deve fazer parte do tratamento padrão de todos os doentes com LLA-Ph⁺.

Apesar de serem observadas boas taxas de resposta inicial, com a introdução dos ITC, a reincidência da doença permanece como a maior causa de morte nestes doentes. Há, por isso, necessidade de inclusão de novos ITC, como o ponatinib, que é capaz de contornar a resistência à terapêutica relacionada com a mutação T315I, que é uma causa frequente de resistência à LLA-Ph⁺, para alcançar, potencialmente, respostas mais duradouras^{24,25}.

3.3. Mecanismos de Resistência à Terapêutica

Neste ponto será abordada, fundamentalmente, a resistência à terapêutica com os ITC, dado serem considerados chave no aumento das taxas de sobrevivência a longo prazo dos doentes com LMC e LLA-Ph⁺, devido à sua menor toxicidade face às outras abordagens terapêuticas disponíveis e por terem revolucionado o tratamento destas patologias, na medida em que, inibem o principal mecanismo que está na origem da patogénese destas doenças, isto é, inibem a atividade cinase constitutiva da proteína BCR-ABL.

Apesar dos ITC terem revolucionado a terapêutica da LMC e da LLA-Ph⁺, alguns doentes apresentam resistência a certos fármacos deste grupo terapêutico^{10,23}, em particular, ao IM, o que não invalida a existência de resistência a outros fármacos deste grupo (como o dasatinib e o nilotinib), no entanto, ocorrem com menor frequência²⁶.

O desenvolvimento de mutações pontuais no domínio cinase do gene *BCR-ABL* representa o mecanismo de resistência mais comum aos ITC, sendo encontradas em cerca de 80% a 90% dos doentes com LLA-Ph⁺ recidivante, bem como, em cerca de 40% a 90% dos casos recidivantes de LMC, ambos a tomarem imatinib^{25,26}. Dado ser o mecanismo mais comum, serão descritas apenas essas mutações, apesar da existência de outros mecanismos de resistência dependentes do gene *BCR-ABL* (sobre-expressão e amplificação do gene), bem como mecanismos não dependentes do gene de fusão, envolvendo fatores associados ao metabolismo e ao transporte de fármacos para o interior das células-alvo²¹.

As mutações pontuais podem ocorrer, fundamentalmente, em quatro zonas distintas do domínio tirosina cinase do gene *BCR-ABL*: diretamente no local de ligação do ATP, no loop-P, no loop de ativação da cinase (loop-A) ou, ainda, no próprio domínio catalítico da cinase (domínio C). O impedimento da ligação do IM e dos outros ITC de segunda geração à proteína mutada resulta, essencialmente, da substituição de aminoácidos críticos à ligação destes fármacos ou da substituição de aminoácidos essenciais para a estrutura conformacional da cinase, que ao ser alterada, impede a ligação de certos fármacos deste grupo (Anexo I – Figura 7)²⁶. Exemplos de mutações relativas à primeira situação temos a T315I, localizada no local de ligação ao ATP e a F359V localizada no domínio catalítico da

proteína cinase, sendo que esta última afeta mais a ligação dos fármacos IM e nilotinib. Relativamente à segunda situação, como exemplos temos as mutações que compreendem o loop-P (M244V, G250E, Q252H, Y253F/H, E255K/V) que diminuem a flexibilidade da proteína BCR-ABL e alteram o estado conformacional necessário à ligação do IM e nilotinib, essencialmente (embora com o nilotinib a resistência seja menor), pois estes dois fármacos ligam-se à conformação inativa da proteína, ao passo que o dasatinib liga-se à conformação ativa, não havendo esse problema. Mutações no loop-A (H396R/P) também afetam a conformação da proteína de fusão, impedindo que esta adote a conformação inativa necessária à ligação do IM^{10,26} (Anexo I - Figura 7).

A mutação T315I, substituição de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315 da cinase, foi a primeira mutação descrita nestes doentes e é a que tem pior prognóstico. Esta substituição de aminoácidos, cria um impedimento estérico, não permitindo efetivamente a ligação do IM, dasatinib e nilotinib à proteína BCR-ABL²¹. No entanto, já existem estratégias terapêuticas em estudo no sentido de contornar o problema provocado por esta mutação, como sendo o ponatinib, como referido no ponto 3.1.²².

A presença destas mutações pode alterar o grau de resistência de cada um dos clones. Assim, podemos ter clones totalmente resistentes e outros parcialmente resistentes, revelando diferentes sensibilidades aos ITC (imatinib, dasatinib e nilotinib) (Anexo I – Figura 7)²⁶. No caso dos parcialmente resistentes, o aumento da dose do fármaco administrado pode ser eficaz a contornar a resistência à terapêutica.

As mutações pontuais não são induzidas pela atividade inibitória dos ITC, no entanto, a presença dos ITC após a aquisição da mutação atua como um mecanismo de seleção dos clones insensíveis ao tratamento que, por expansão clonal, levam progressivamente à ineficácia terapêutica destes fármacos em determinadas situações²¹.

Por estes motivos, a monitorização do tratamento tem um papel importante no sucesso desta terapêutica revolucionária, pelo que será abordada no ponto 4.2..

4. Ensaios Laboratoriais para Diagnóstico e Monitorização da Terapêutica

A escolha de ensaios laboratoriais congruentes e a obtenção de resultados fidedignos são questões determinantes na definição do estado do doente, durante a evolução natural da doença, bem como, na monitorização da resposta à terapêutica, tornando-se uma ferramenta fundamental no direcionamento de terapêuticas adequadas e ajustadas às necessidades dos doentes.

4.1. Diagnóstico

Para estabelecer o diagnóstico da LMC devem ser considerados diversos parâmetros, que carecem de estudos laboratoriais e clínicos exaustivos. Entre eles temos, designadamente, a medição da esplenomegalia, o hemograma completo com contagem diferencial (tendo especial atenção à percentagem de basófilos, eosinófilos e blastos), o mielograma, a biópsia óssea para avaliação de fibrose, a determinação do cariótipo na medula óssea (Nota: a hibridização *in situ* (FISH) no sangue periférico (SP) para Ph[t(9;22)] só tem indicação quando o cariótipo não é interpretável ou quando a medula óssea não está disponível), o PCR-qualitativo (*reverse-transcription polymerase chain reaction* [RT-PCR]) para identificar o tipo de transcrito *BCR-ABL*¹², sendo que a presença deste constitui uma característica patognomónica na maior parte dos casos de LMC²⁷ e o PCR-quantitativo (*real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction* [RQ-PCR])^{10,12}. Estas técnicas de diagnóstico são também importantes para identificar em que fase da LMC se encontra o doente, bem como na definição do risco relativo de cada doente¹².

No âmbito deste trabalho, propôs-se evidenciar, fundamentalmente, as técnicas de citogenética e o seu contributo enquanto *gold standard* na deteção do cromossoma Ph (em fase diagnóstico) e na monitorização da resposta citogenética (em fase de acompanhamento clínico-terapêutico). Acresce, ainda, a importância na identificação de aberrações cromossómicas adicionais¹⁰.

De entre as desvantagens da citogenética convencional está a sua baixa sensibilidade, comparativamente aos métodos de diagnóstico moleculares como a FISH e o PCR quantitativo que se mostram mais sensíveis^{10,27}. Uma outra desvantagem é o atraso na obtenção dos resultados devido à necessidade de obter células em crescimento e à necessidade de aspiração da medula óssea enquanto fonte de células em divisão para a análise das metafases. Apesar destes pontos fracos, os estudos citogenéticos continuam a ser preferidos como método de diagnóstico de primeira linha, tendo como vantagem a ampla disponibilidade do equipamento em grande parte dos laboratórios¹⁰.

No âmbito da citogenética molecular a técnica utilizada no diagnóstico é a FISH, que se baseia na utilização de sondas de DNA marcadas com um fluorocromo, específicas para a região em estudo, emitindo fluorescência, caso haja hibridização com a sequência de DNA alvo. Esta técnica tem o intuito de mapear a localização cromossómica de genes, especialmente o *BCR-ABL*, e identificar anomalias genéticas. Esta ferramenta constitui-se como um método de avaliação rápido e mais sensível, podendo ser aplicado em vários

estados do ciclo celular e é particularmente útil quando uma grande quantidade de células afetadas está presente¹⁷.

Também utilizado no diagnóstico, o RT-PCR é uma técnica que deteta o mRNA que codifica para a proteína quimérica BCR-ABL nas amostras de medula óssea e sangue periférico. Em relação à FISH, esta técnica é mais sensível^{10,17}.

Relativamente à LLA-Ph⁺, o diagnóstico é efetuado com base na análise da medula óssea e sangue periférico, sendo que outros estudos devem ser realizados para se proceder à categorização e subclassificação da doença (estudos citoquímicos, marcadores imunológicos, análise citogenética e estudos moleculares genéticos). Particularmente, e cingindo-nos ao objeto central deste tópico, os estudos citogenéticos são os mais fidedignos e com maior sensibilidade, tendo um nível de detecção de 10^{-6} para o gene BCR-ABL. Tal como referido anteriormente, estas técnicas são também utilizadas no diagnóstico da LMC, sendo, portanto, mais úteis na detecção inicial das aberrações e considerados métodos de diagnóstico de rotina¹³.

Uma questão perene na promoção da eficiência dos diagnósticos da LMC e LLA-Ph⁺ diz respeito ao desenvolvimento de uma norma *standard* internacional de ensaios laboratoriais que, até à presente data, não há conhecimento de que tenha sido efetivada¹⁰.

4.2. Monitorização da Terapêutica

Várias terapêuticas, gradativamente mais efetivas, têm vindo a ser desenvolvidas, desde a descoberta da LMC, pelo que a definição da resposta ao tratamento se tornou uma necessidade premente. Sendo assim, a “cura” na LMC é atingida quando ocorre, simultaneamente, resposta molecular completa (CMoR – *Complete Molecular Response*), isto é, ausência de transcritos de BCR-ABL, resposta hematológica completa (CHR – *Complete Hematologic Response*), ou seja, uma normalização da contagem de células do sangue e resposta citogenética completa (CCyR – *Complete Cytogenetic Response*), que corresponde à erradicação das células da medula que contêm o cromossoma Ph¹⁰.

A monitorização da LMC e LLA-Ph⁺ é feita através de testes laboratoriais que avaliam, de forma sistemática, a doença residual mínima (DRM), que corresponde ao número de células neoplásicas detetáveis durante ou após o tratamento destas doenças^{13,28}.

Os objetivos da monitorização da DRM nas leucemias incluem a demonstração da efetividade do tratamento inicial, a monitorização da resistência à terapêutica e, por conseguinte, erradicar os mecanismos relacionados com o insucesso terapêutico, com o intuito de selecionar opções terapêuticas alternativas. A metodologia de monitorização da

DRM é influenciada pelo diagnóstico e, conseqüentemente, pelo prognóstico associado a cada leucemia, bem como pelas opções terapêuticas disponíveis para cada caso específico²⁸.

Os métodos de monitorização de eleição na LMC continuam a ser as análises citogenéticas, porém, com a necessidade crescente de maior sensibilidade face ao aparecimento de novas terapêuticas, a utilização de métodos como a FISH, o PCR qualitativo e o PCR quantitativo tornaram-se fundamentais^{10,12,28}.

Para avaliação da resposta citogenética são habitualmente utilizadas duas técnicas, o cariótipo medular e a FISH. O estudo do cariótipo é a única técnica disponível de avaliação de todos os cromossomas em simultâneo, o que é muito importante, dada a possibilidade de ocorrência de anomalias cromossômicas adicionais ao Ph. Este estudo realiza-se aquando do diagnóstico e a cada 12 meses a partir dessa data^{10,28}. A FISH, apesar de ser mais sensível do que o cariótipo medular, não deteta as anomalias cromossômicas adicionais, apenas o gene de fusão *BCR-ABL*. Este método revela-se de grande utilidade diagnóstica, quando não é possível obter metafases. Contudo, o seu valor prognóstico na monitorização da LMC não está estabelecido¹².

A técnica utilizada para monitorizar a resposta molecular na LMC é o PCR-quantitativo (RQ-PCR), que permite quantificar o número de transcritos *BCR-ABL* presentes. Recomenda-se que a quantificação destes transcritos seja efetuada a cada 3 a 6 meses, até se atingir a resposta molecular *major* ($\leq 0,1\%$ de transcritos *BCR-ABL*) e, posteriormente, a cada 6 meses. No entanto, se ocorrer um aumento do *BCR-ABL* numa só ocasião, o intervalo de monitorização deverá ser reduzido para um mês. Caso se observe subida do *BCR-ABL* em duas medições consecutivas ou aumento significativo do nível de *BCR-ABL*, devem ser realizados o estudo de mutações (sequenciação de DNA) e o cariótipo medular^{10,12}.

É de notar que as técnicas supracitadas podem ser utilizadas em associação ou separadamente, na monitorização dos doentes com LMC, dependendo da abordagem escolhida, uma vez que, não existe consenso quanto à abordagem ótima de monitorização. Há desacordos relativamente à sequência e ao tipo de técnica a ser utilizada.

Uma outra abordagem à qual os autores de um artigo tomaram a liberdade de chamar “*I-don't-care-about-any-such-studies*” (“não me importo com qualquer um destes estudos”), fala-nos do custo-benefício da monitorização em doentes idosos (≥ 70 anos), propondo que não se mude a terapêutica a não ser que surjam evidências inequívocas de recaídas hematológicas (aumento do número de células leucémicas), que podem ser detetadas no sangue periférico. Esta abordagem pode retardar intervenções terapêuticas benéficas, diminuindo a eficiência das mesmas dado o estado avançado da doença²⁸.

A quantificação do transcrito *BCR-ABL* pelo RQ-PCR é, frequentemente, utilizada para monitorizar a DRM, nos doentes com LLA-Ph⁺. Todavia, a prática e interpretação dos resultados não é clara, não havendo uma definição de resposta ótima, nem da frequência ótima de monitorização, ao contrário da LMC, em que há mais evidências. No futuro, com um melhor entendimento da cinética das mutações *BCR-ABL*, com um leque mais alargado de ITC disponíveis e com um melhor entendimento da relação entre os diferentes subclones *BCR-ABL* e a evolução da doença a longo prazo, a prática da monitorização serial de mutações *BCR-ABL* irá assumir uma maior importância. Atualmente, o impacto mais imediato da monitorização do transcrito *BCR-ABL*, nestes doentes, é na terapia após o alloHSCT²³.

5. Conclusão

Na presente monografia, foi realizada uma abordagem aprofundada a uma anomalia cromossômica específica, denominada, cromossoma Filadélfia, que está relacionada com tipos de cânceres particulares, nomeadamente, a LMC e a LLA-Ph⁺.

O cromossoma Filadélfia resulta de uma translocação recíproca de DNA entre os cromossomas 9 e 22, originando um gene de fusão *BCR-ABL* que codifica uma proteína quimérica (*BCR-ABL*) com atividade tirosinacina desregulada. O reconhecimento da importância desta desregulação no processo tumoral das doenças associadas a este cromossoma, levou ao desenvolvimento de novos fármacos inibidores desta atividade tirosinacina alterada. Esta descoberta revolucionou o tratamento destas patologias, na medida em que, permitiu o controlo da sua progressão, estando associadas, na maioria dos casos, a taxas de sobrevivência superiores às aquelas obtidas com as terapêuticas efetuadas anteriormente a esta descoberta.

É de salientar, que tudo isto só foi possível graças ao desenvolvimento de metodologias laboratoriais de análise do cromossoma Filadélfia a vários níveis, nomeadamente, citogenético e molecular, bem como de metodologias de avaliação da proteína de fusão *BCR-ABL* resultante da sua transcrição. Estas técnicas, designadamente, estudo do cariótipo, FISH, RT-PCR, RQ-PCR, entre outras não relacionadas com o cromossoma Filadélfia em si, mas com significado clínico relevante, têm implicações importantes no estabelecimento de um diagnóstico correto, bem como na monitorização destes doentes, relativamente à resposta ao tratamento. Deste modo, e para finalizar, constata-se a enorme relevância da deteção do cromossoma Filadélfia tanto no diagnóstico como na monitorização da terapêutica das doenças a ele associadas, pelo que o objetivo desta monografia foi cumprido.

É também importante notar que apesar dos importantes desenvolvimentos, quer em termos de métodos de diagnóstico e monitorização da doença, quer em terapêutica, questões como a formulação de uma norma padrão internacional para o diagnóstico e monitorização permanecem em aberto, sendo que, a criação desta norma seria um importante contributo para uma maior coordenação de procedimentos, favorecendo a comparação de resultados e a reprodutibilidade entre os estudos.

Por outro lado, para que se possam solucionar estas e outras questões, é fundamental uma maior aposta na investigação e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, métodos de diagnóstico e de monitorização mais sensíveis e mais custo-efetivas.

6. Referências Bibliográficas

1. IARC, International Agency for Research on Cancer (WHO). **Fact Sheets by Cancer**. (2012) [Acedido a 30 de Maio de 2014]. Disponível na Internet: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. NUSSBAUM, R. et al. – **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 7ªEd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. ISBN 978-1-4160-3080-5.
3. REGATEIRO, F. – **Manual de Genética Médica**. 1ªEd. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2003. ISBN 972-8704-12-7.
4. MITELMAN, F. – **Cancer: Chromosomal Abnormalities**. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd., 2010. [Acedido a 10 de Janeiro de 2014]. Disponível na Internet: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0005552.pub2/full>
5. SMITH, J. et al. – **Using Cytogenetic Rearrangements for Cancer Prognosis and Treatment (Pharmacogenetics)**. Curr. Genet. Med. Rep., 1 (2013) 99-112.
6. HEIM, S.; MITELMAN, F. – **Cancer Cytogenetics**. 3ªEd. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-18179-9.
7. PANE, F. et al. - **BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations**. Oncogene, 21 (2002) 8652-8667.
8. KANTARJIAN, H. et al. – **Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics**. Ann. Intern. Med, 138, 10 (2003) 819-830.
9. CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. – **Molecular Biology and Cytogenetics of Chronic Myeloid Leukemia**. In: WIERNIK, P. et al. – Neoplastic Diseases of the Blood. 5ªEd. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-3763-5, p. 29-44.
10. TOHAMI, T. et al. – **Laboratory Tools for Diagnosis and Monitoring Response in Patients with Chronic Myeloid Leukemia**. IMAJ, 14 (2012) 501-507.
11. BAIN, B. – **Pathology of the Chronic Myeloid Leukemias**. In: WIERNIK, P. et al. – Neoplastic Diseases of the Blood. 5ªEd. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-3763-5, p. 19-28.
12. ALMEIDA, A. et al. – **Recomendações para o Diagnóstico, Tratamento e Monitorização da Leucemia Mielóide Crónica**. Acta Med. Port., 22, 5 (2009) 537-544.
13. TUZUNER, N.; BENNETT, J. - **Classification of the Acute Leukemias: Cytochemical and Morphologic Considerations**. In: WIERNIK, P. et al. – Neoplastic Diseases of the Blood. 5ªEd. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-3763-5, p. 213-239.

14. CONTER, V. et al. – **Acute Lymphoblastic Leukemia**. Orphanet Encyclopedia, 2004. [Acedido a 1 de Junho de 2014]. Disponível na Internet: <https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf>
15. LEE, H. et al. – **Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia**. *Cancer*, 117 (2011) 1583-1594.
16. FIORETOS, T.; JOHANSSON, B. – **Chronic Myeloid Leukemia**. In: *Cancer Cytogenetics*. 3ªEd. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-18179-9 p. 179-207.
17. FRAZER, R. et al. – **Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st Century**. *The Ulster Med. J.*, 76, 1 (2007) 8-17.
18. TEFFERI, A.; GILLILAND, D. – **Oncogenes in Myeloproliferative Disorders**. *Cell Cycle*, 6, 5 (2007) 550-566.
19. DEININGER, M. et al. – **The molecular biology of chronic myeloid leukemia**. *Blood*, 94, 10 (2000) 3343-3356.
20. ADVANI, A.; PENDERGAST, A. – **Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects**. *Leukemia Research*, 26, 8 (2002) 713-720.
21. WALZ, C.; SATTLER, M. – **Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)**. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57 (2006) 145-164.
22. PRICE, K. et al. – **Potencial of Ponatinib to Treat Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia**. *OncoTargets and Therapy*, 6 (2013) 1111-1118.
23. FIELDING, A. – **Current Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia**. *ASH Education Book*, 2011, 1 (2011) 231-237.
24. KANTARJIAN, H. et al. – **Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Treatment Options**. *Curr. Oncol. Rep.*, 14 (2012) 387-394.
25. OTTMANN, O.; PFEIFER, H. – **Management of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph⁺ ALL)**. *ASH Education Program*, 2009, 1 (2009) 371-381.
26. QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. – **Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leucemia**. *Blood*, 113, 8 (2009) 1619-1630.
27. O'BRIEN, S.; GOLDMAN, J. – **Diagnosis and Treatment of the Chronic Myeloid Leukemia**. In: WIERNIK, P. et al. – *Neoplastic Diseases of the Blood*. 5ªEd. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-3763-5, p. 45-62.
28. KANTARJIAN, H. et al. – **Monitoring the Response and Course of Chronic Myeloid Leukemia in the Modern Era of BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors:**

Practical Advice on the Use and Interpretation of Monitoring Methods. Blood, 111, 4 (2008) 1774-1780.

ANEXOS

Anexo I

		Imatinib (nM)	Nilotinib (nM)	Dasatinib (nM)
	Native BCR-ABL1	260	13	0.8
P-loop	M244V	2000	38	1.3
	G250E	1350	48	1.8
	Q252H	1325	70	3.4
	Y253H	>6400	450	1.3
	Y253F	3475	125	1.4
	E255K	5200	200	5.6
	E255V	>6400	430	11
	V299L	540	NA	18
		F311L	480	23
ATP binding site	T315I	>6400	>2000	>200
	T315A	971	61	125
	F317L	1050	50	7.4
	F317V	350	NA	53
Catalytic domain	M351T	880	15	1.1
	E355G	2300	NA	1.8
	F359V	1825	175	2.2
	V379I	1630	51	0.8
		L387M	1000	49
A-loop	H396R	1750	41	1.3
	H396P	850	41	0.6

High sensitivity

Intermediate sensitivity

High insensitivity

Figura 7 – Atividade dos ITC (imatinib, nilotinib e dasatinib) às diferentes formas mutantes da proteína BCR-ABL, refletindo a sensibilidade a estes fármacos. Destaque com a seta azul da mutação T315I que é muito pouco sensível a estas moléculas. (Imagem adaptada de: QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. – Molecular biology of bcr-abl I-positive chronic myeloid leucemia. Blood, 113, 8 (2009) 1619-1630)²⁶.