

# Evolução da Biologia Molecular nos Síndromes Mieloproliferativos Crónicos e Aplicação do seu diagnóstico na actualidade

Catarina Rua<sup>1</sup>, Tânia Santos<sup>1</sup>, Elisa Ramírez<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Victoria de Olabarría<sup>2</sup>, Mónica Herrera<sup>2</sup>, Ana Jaleco<sup>1</sup>

## Resumo

O termo *Síndrome Mieloproliferativo Crónico* descreve um grupo de patologias (neoplasias hematológicas) que têm como característica comum a proliferação descontrolada (clonal) de um ou mais componentes hematopoiéticos da medula óssea e, em muitos casos, do baço e do fígado.

Dentro dos Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (SMC) os mais comuns são: Policitemia Vera (PV); Leucemia Mielóide Crónica (LMC); Mielofibrose; Trombocitemia Essencial (TE).

Este trabalho centrou-se na PV e LMC.

A PV é um transtorno das células sanguíneas precursoras que provoca um excesso de glóbulos vermelhos, que está na origem numa mutação somática na posição 617 no Jak2 quinase.

A LMC estimula um aumento da produção de glóbulos brancos na medula óssea e está relacionada com uma alteração cromossómica – translocação recíproca entre os braços largos dos cromossomas 9 e 22 (gene de fusão BCR-ABL) – Cromossoma Philadelphia. O produto de transcrição do gene de fusão BCR-ABL origina dois tipos de proteína quimérica, com actividade tirosina quinase desregulada, que diferem em tamanho, denominadas p190 e p210.

A realização deste estudo teve como principais objectivos o Diagnóstico Molecular da PV e LMC em amostras de pacientes recebidas no Departamento de Biologia Molecular do Laboratório Unilabs e a realização de um estudo a nível estatístico de todas as amostras analisadas, neste departamento, durante o ano 2010.

Com as amostras analisadas para a determinação da mutação V617F do gene Jak2, 22% apresenta a dita mutação pontual. Dada esta percentagem e os sintomas observados pelo hematólogo (Leucocitose, Poliglobulia, etc) reforçam a necessidade e relevância de diagnosticar PV com celeridade e eficácia.

---

<sup>1</sup> Universidade Atlântica, Lisboa

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Molecular, Unilabs Diagnósticos S.L.U., Madrid

Para detecção do rearranjo BCR-ABL apenas diagnosticaram-se dois pacientes. Contudo os estudados para seguimento da doença (65) não apresentaram grandes variações na quantificação BCR-ABLp210 durante as revisões trimestrais. É significativo haver um 36% que se mantêm em RMC com o tratamento recebido.

Este estudo foi benéfico, na medida em que a observação de determinados sintomas por parte do hematólogo, permitirá solicitar uma determinada prova de diagnóstico, rápida e fiável, que será crucial na aplicação de um tratamento efectivo.

A tecnologia utilizada para o diagnóstico destes síndromes está em constante evolução, sendo esta paralela aos progressos e novos descobrimentos da medicina, assim como ao contínuo desenvolvimento dos sistemas de informação de apoio ao diagnóstico.

**Palavras-chave:** Síndromes Mieloproliferativas Crónicas, Policitemia Vera, mutação V617F, Leucemia Mielóide Crónica, rearranjo BCR-ABL, Biologia Molecular.

## Introdução

### Síndromes Mieloproliferativas Crónicas. Definição e Classificação

Os Síndromes Mieloproliferativas Crónicas são doenças em que as células precursoras produzem células sanguíneas que crescem, e reproduzem-se anormalmente na medula óssea ou são expulsas da mesma, devido a uma produção excessiva do tecido fibroso [1].

O hematólogo William Dameshek (1969) descreveu o conceito de Síndromes Mieloproliferativas Crónicas (MPDs) em 1951, no jornal *Blood* [1]. Considerou a Leucemia Mielóide Crónica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose primária (MFP) e eritroleucémia (síndrome de Di Guglielmo) [2].

Em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) através do comité para a classificação das neoplasias mielóides, atribuiu o clássico MPDs como a categoria mais ampla de doenças mieloproliferativas crónicas (CMPDs), incluindo também a Leucemia Neutrófila crónica (CNL) e a Leucemia Eosinofílica crónica (CEL) [3].

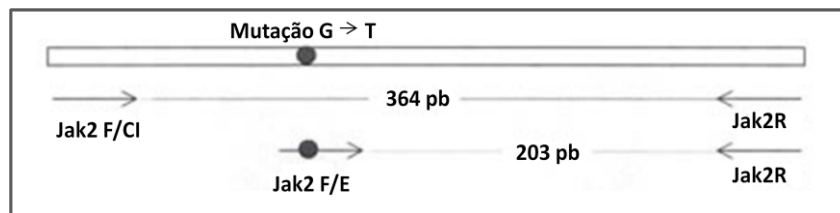
## Policitémia Vera (PV)

A Policitémia Vera é um transtorno das células sanguíneas precursoras que provoca um excesso de glóbulos vermelhos. Este transtorno é raro, pois só se manifesta em 5 pessoas por cada milhão. A idade que se diagnostica este transtorno é entre os 60 anos, contudo pode-se manifestar-se mais cedo [4].

Após classificação dos MPDs, o passo seguinte foi tentar identificar as origens de sinalização de activação crónica em MPDs [4].

Em 2005, quatro grupos diferentes identificaram, uma mutação somática (troca da uma valina por uma fenilalanina) na posição 617 (V617F) no Jak2 quinase. Esta mutação está generalizada em pacientes com MPDs adquiridos. Jak2 V617F está presente numa fracção das células mielóides em praticamente em todos os pacientes com PV e aproximadamente metade dos pacientes com ET ou MFP [5-9].

A mutação V617F detecta-se, mediante a PCR-Alelo específica, segundo o método descrito por Baxter et al. [5]. Esta PCR está desenhada de forma, a que se utiliza 3 primers diferentes denominados Jak2R, Jak2F/E e Jak2F/CI (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema da Reacção da Polimerase em cadeia (PCR) Alelo-específica para ampliar um fragmento do gene Jak2.

Os primers Jak2F/CI e Jak2R amplificam um produto de 364 pb independentemente da presença ou ausência da mutação, a qual se utiliza como controlo da técnica. Os primers Jak2R e Jak2F/E amplificam um produto de 203pb somente quando a mutação está presente [5,10].

Sem tratamento, mais de metade dos doentes que padecem de PV, morrem em menos de dois anos. O objectivo do tratamento é atrasar a produção de glóbulos vermelhos, e assim diminuir a sua quantidade, este processo é controlado através de uma técnica denominada Flebotomia [11-13].

## **Leucemia Mielóide Crónica (LMC)**

A Leucemia Mielóide Crónica ou leucemia granulócítica crónica é uma enfermidade na qual existe um aumento da produção de glóbulos brancos na medula óssea [13]. A função da medula óssea é produzir células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas), por isso neste órgão observam-se células jovens não diferenciadas, nos grupos de células acima mencionado [12].

Na Leucemia dos blastos (células imaturas), estas transformam-se em leucócitos polimorfonucleares em elevado número [14].

Em 1959 Peter Nowel e David Hungerford [10] identificaram a primeira alteração cromossómica associada a uma doença maligna, a Leucemia Mielóide Crónica (LMC). As metafases dos pacientes analisados, contavam com um cromossoma mais pequeno que o normal, a que se chamou Cromossoma de Philadelphia. Doze anos depois, Janet D.Rowley demonstrou que este cromossoma era consequência de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, e não apenas devido a perda de material genético do cromossoma 22, como até então se pensava [14,15].

Passaria uma década até identificar os genes implicados nesta translocação e clonar o mRNA de fusão [16]. Estudos posteriores colocaram em evidência que a fusão BCR-ABL, a que nos referimos era essencial para a génese da LMC [17]. Ainda que no princípio a presença do Cromossoma Philadelphia estivesse associada a LMC, encontrou-se este mesmo marcador em alguns linfoblastos de pacientes afectados com Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL), geralmente pacientes adultos; contudo, ao contrário do que se sucede na LMC, o ponto de ruptura no gene BCR destes pacientes é diferente e dá-se no primeiro intrão. Por outro lado a mesma anomalia citogenética produz dois oncogenes diferentes, BCR-ABL p190 e p210, que se associam especificamente com LMC e LAL, respectivamente. [19]

Esta anomalia cromossómica é originada por uma translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22  $t(9;22)(q34;q11)$  [20].

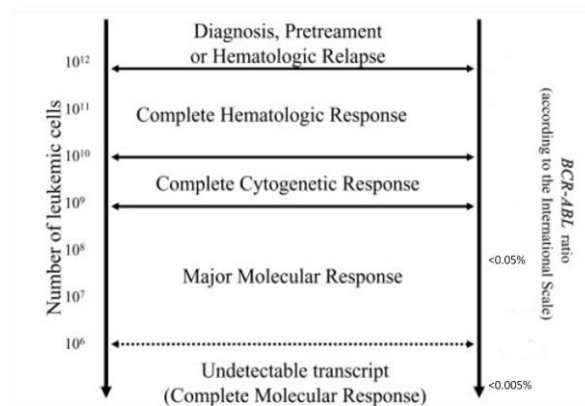
No cromossoma 22 encontra-se a região BCR (breakpoint cluster region), denominada também por gene BCR, onde se pode distinguir a região maior (M-bcr – major breakpoint cluster region) entre os exões 12 e 16 (originalmente descritos como exões b1-b5); a região menor (m-bcr) é inserida entre os exões e1 e e2 e a micro região ( $\mu$ -bcr) no exão 19 [20].

Quando uma parte do gene ABL (Abelson) localizado no cromossoma 9, é transferida e inserida dentro do gene BCR, origina-se um gene de fusão BCR-ABL [20].

O produto de transcrição do gene de fusão BCR-ABL origina dois tipos de proteína quimérica, com actividade tirosina quinase desregulada, que diferem em tamanho, denominadas p190 e p210.

O acompanhamento da doença é uma das estratégias chave para a gestão de LMC para avaliar o tratamento e detectar recidivas precoces. O objectivo do tratamento da LMC é lograr ao desaparecimento total do cancro, que normalmente progride de uma remissão hematológica a uma remissão citogenética [21].

A figura seguinte demonstra a correspondência esquemática entre o número de células leucémicas, a resposta ao tratamento e nível de transcrito BCR-ABL Mbc.



**Figura 2.** Relação aproximada entre a resposta, o número de células leucémicas e o nível de transcritos BCR-ABL Mbc. Com a técnica implementada no Laboratório Unilabs no departamento de Biologia Molecular, considera-se Resposta Molecular Maior uma expressão do transcrito BCR-ABL relativo a ABL <0.05% e a Resposta Molecular Completa com uma expressão <0.005% [21].

O método convencional para estimar a carga tumoral em pacientes com LMC é a análise citogenética convencional (banda G) nas metáfases da medula óssea. Contudo, as análises em bandas cromossómicas requerem bastante trabalho e muito tempo, e o número limitado de células analisadas provoca uma alta variabilidade dos resultados, com uma sensibilidade aproximada de 5% se examinar-se 20 metáfases. Além do mais, pode produzir metáfases insuficientes em 10-20% dos casos [22].

A frequência de análises citogenéticas pode reduzir, se observarmos os pacientes com LMC por métodos moleculares, como por exemplo a Reacção da Polimerase em cadeia em tempo real (RQ-PCR) para a detecção do mRNA de BCR-ABL Mbc, nos quais pode-se realizar em amostras de sangue periférico, portanto são menos agressivos que as análises convencionais de metáfase de medula óssea e muito mais sensíveis. Vários estudos têm demonstrado uma boa correlação entre os critérios de resposta citogenética estabelecida e os valores de RQ-PCR [23-25].

A metodologia actual para medir o nível de mRNA de BCR-ABL Mbc implica o uso da Reacção da Polimerase em cadeia em tempo real (RQ-PCR), assim sendo o número de transcritos de BCR-ABL Mbc possui uma relação com o número de transcritos de um gene controlo [19].

## **Materiais e Métodos**

### **Seleção da amostra**

Analisaram-se amostras de sangue periférico em EDTA de pacientes com um potencial ou previamente diagnosticado SMC, recebidas no Departamento de Biologia Molecular do Laboratório Unilabs durante o ano 2010, para a detecção da mutação V617F do gene Jak2 e para a quantificação do rearranjo BCR-ABL.

### **Determinação da mutação V617F do gene Jak2**

#### *Extracção de DNA*

A extracção de DNA genómico realiza-se a partir de aproximadamente 9 mL de sangue periférico com EDTA. Os granulócitos isolam-se mediante um gradiente de densidade, por centrifugação com Lymphoprep (Axis-Shield).

Centrifuga-se quantidades equivalentes de Lymphoprep e de EDTA a 1600rpm durante 30 minutos. Realiza-se um lavado ao pellet de granulócitos com 50mL de PBS (GIBCO), centrifugando a 1600rpm durante 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se Buffer EL (Erythrocyte lysis buffer – QIAGEN) sobre o pellet. Incuba-se a 15 minutos em gelo. Centrifuga-se a 1600rpm durante 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se PBS sobre o pellet. Centrifuga-se a 1600rpm durante 10 minutos.

Descarta-se o sobrenadante e transfere-se o pellet para um tubo de 1.5mL com 1mL de PBS. Centrifuga-se a 13000rpm durante 2 minutos. Descarta-se o sobrenadante e provoca-se a lise dos neutrófilos do pellet com 600 µl de DNAzol Reagent (invitrogen) seguindo as instruções facilitadas pelo provedor.

Sobre o lisado adiciona-se 650µl de Etanol 100% e agita-se suavemente para se precipitar o DNA. Retira-se o Etanol e lava-se o DNA precipitado, duas vezes, com uma dissolução de Etanol a 70%. Por último lava-se com uma dissolução de Etanol a 90% e deixa-se secar o DNA. Ressuspende-se o DNA seco em DEPC Treated Water (invitrogen) e conserva-se a 4°C.

#### *Reacção da Polimerase em cadeia (PCR- Alelo específica)*

A mutação V617F detecta-se a partir do DNA genómico, previamente obtido mediante a PCR- Alelo específica, segundo o método descrito por Baxter et al. [5]. Esta PCR está desenhada de forma, a que se utiliza 3 primers diferentes denominados Jak2R, Jak2F/E e Jak2F/CI.

O primer Jak2F/E é específico para o alelo mutante e o primer Jak2F/CI encontra-se em todos os indivíduos independentemente da presença ou não da mutação, isto é constitui um controlo interno da reacção. Desta forma, como em todos os indivíduos amplifica-se um produto de 364 pb com os primers Jak2F/CI e Jak2R, é somente os indivíduos que apresentam a mutação obtêm um produto de 203 pb utilizando os primers Jak2F/E e Jak2R.

A amplificação por PCR realiza-se num volume final de 50µl utilizando a enzima Taq DNA Polymerase (invitrogen) seguindo as instruções facilitadas por provedor.

O programa de PCR utilizado consta de 45 ciclos e se inicia com uma desnaturação de 5 minutos a 95°C, para logo iniciar os ciclos: 1 min a 95°C, 1min a 58°C e 1min a 72°C, terminado com uma extensão final de 10min a 72°C. Conserva-se a 4°C.

Incluí-se em todas as reacções um controlo negativo que contém todos os reactivos necessários para a amplificação, substituindo-se o molde de DNA por água; um controlo positivo, adicionando-se um DNA de um paciente portador da mutação e um controlo wild type (wt) de um paciente que não é portador da mutação. A verificação do produto de PCR esperado realiza-se num Gel de Agarose MS-8 a 2% (pronadisa) em TAE 1X (GIBCO), corado com Brometo de Etídio (invitrogen).

## **Determinação por PCR em tempo real de transcritos BCR-ABL**

### *Extracção de RNA*

Separar-se a população branca a partir de aproximadamente 9 mL de sangue com EDTA. Centrifuga-se as amostras 1800 rpm, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Este processo separará uma fase superior de plasma, uma fase inferior com a série vermelha e uma interfase entre elas com a série branca (buffy coat). Retira-se a parte branca e passa-se a um tubo limpo. Adiciona-se Buffer EL (Erythrocyte lysis buffer – QIAGEN) até 50 mL e agita-se. Incuba-se durante 10 minutos em gelo e de seguida centrifuga-se a 1600 rpm durante 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante. Lava-se o pellet de leucócitos, adicionando-se PBS (GIBCO) até 50 mL e centrifuga-se 1600 rpm durante 10 minutos. Novamente, descarta-se o sobrenadante e faz-se um lavado com PBS. Descarta-se o sobrenadante e resuspende-se o pellet celular em 1 mL de PBS. Centrifuga-se a 13.000 rpm durante 1 minuto. Descarta-se o sobrenadante e coloca-se 1 mL de TRIzol LS Reagent (invitrogen). Congela-se o tubo a -80°C. Descongela-se à temperatura ambiente e coloca-se 200µl de Chloroform, ACS Reagent ≥ 99,8% (SIGMA – ALDRICH).

Agita-se vigorosamente durante 15 segundos e incuba-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifuga-se a 11.400 rpm durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação existe duas fases: fase inferior ou orgânica (contém o DNA e proteínas) e fase superior ou aquosa (RNA). Transfere-se a parte superior a um tubo novo (aproximadamente 500µl). Coloca-se 500µl de Isopropyl alcohol (CARLO ERBA) por cada 1mL de TRIzol inicial. Mistura-se, por inversão, e incuba-se o tubo à temperatura ambiente. Centrifuga-se a 11.400 rpm durante 10 minutos a 4°C. O RNA forma um precipitado branco no fundo do tubo. Descarta-se o sobrenadante. Realiza-se dois lavados com Etanol a 70% e de seguida, centrifuga-se a 8900 rpm durante 5 minutos a 4°C. Deixa-se secar o RNA à temperatura ambiente. Ressuspende-se o pellet com DEPC Treated Water (invitrogen) e conserva-se a -80°C.

### *Obtenção do cDNA mediante a transcrição reversa do DNA (RT)*

Para a reacção de RT utilizou-se SuperScript II Reverse Transcriptase (invitrogen) e random primers (invitrogen) seguindo-se as instruções facilitadas pelo provedor.



A metodologia actual para medir a quantidade de mRNA de BCR-ABL implica o uso da reacção de PCR em tempo real, logo o número de transcrito BCR-ABL tem relação com os números transcritos de um gene controlo (gene ABL), assim como o uso de duas rectas padrões elaboradas com amostras standard de quantidades conhecidas do gene ABL e do gene BCR.

Os controlos standards do gene ABL e do gene BCR-ABL utilizados são diferentes dependendo do tipo de transcrito BCR-ABL que se quer amplificar (BCR-ABL p190 ou BCR-ABL p210) (IPSOGEN).

#### *PCR quantitativa a tempo real*

A reacção de PCR quantitativa a tempo real realiza-se no equipamento LightCycler de Roche, utilizando o kit LightCycler FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> HybProbe (Roche) seguindo as instruções facilitadas pelo provedor.

Utilizou-se uma mistura de primers reverse e forward específicos do gene controlo ABL unido a uma sonda FAM-TAMRA específica (IPSOGEN) para amplificar os controlos standards do gene ABL, amostras de pacientes, controlo positivo e controlo negativo (figura 5A); também se utiliza uma mistura de primers reverse e forward específicos do gene de fusão BCR-ABL p190 ou p210 (dependendo do transcrito que queremos amplificar) unidos a uma sonda FAM-TAMRA específica (IPSOGEN) para amplificar os controlos standards BCR-ABL, amostras de pacientes, controlo positivo e controlo negativo.

Para cada paciente efectua-se duas medições, tanto na determinação do gene ABL como na determinação de gene BCR-ABL. Calcula-se uma média entre os valores obtidos. Efectua-se uma divisão entre o valor obtido para o gene BCR-ABL e o obtido para o gene ABL (BCR-ABL/ABL). O dito valor multiplica-se por 100 para calcular-se a percentagem de expressão do transcrito BCR-ABL em relação ao ABL.

## **Resultados**

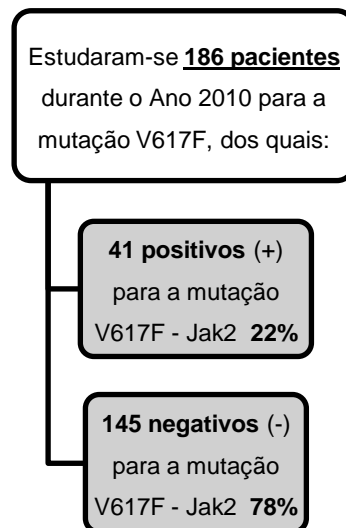
### **Detecção da mutação V617F do gene Jak2**

Durante o ano 2010 analisaram-se 186 amostras de pacientes com possível PV. Os 41 pacientes positivos para mutação V617F do gene Jak2 apresentaram pelo menos um dos seguintes sintomas (Quadro 1).

Sintomas	Número de pacientes
Leucocitose	2
Poliglobulia	5
Trombocitose	14
Trombocitemia Essencial	3
Neutrofilia	3
Outros Sintomas	14

**Quadro 1. Características observadas pelo hematólogo.** A tabela incide nos sintomas detectados pela hematólogo para a requisição da prova de detecção da mutação V617F nos 41 pacientes que resultaram ser portadores da dita mutação. (Leucocitose: Aumento do número de leucócitos; Poliglobulia: Aumento exagerado na actividade da medula óssea, que produz uma quantidade superior de glóbulos vermelhos; Trombocitose: Aumento do número de plaquetas; Trombocitemia Essencial: Grande aumento do número de plaquetas; Neutrofilia: Aumento do número de neutrófilos).

Durante o ano 2010 analisaram-se **186** amostras de pacientes para detecção da mutação V617F no gene Jak2. Os resultados obtidos observam-se na Figura 3.



**Figura 3.** Percentagens de pacientes Portadores da mutação V617F. Um 22% dos pacientes estudados apresentam a mutação V617F. Os restantes pacientes (78%) não manifestam a mutação.

### Determinação dos genes transcritos BCR-ABL

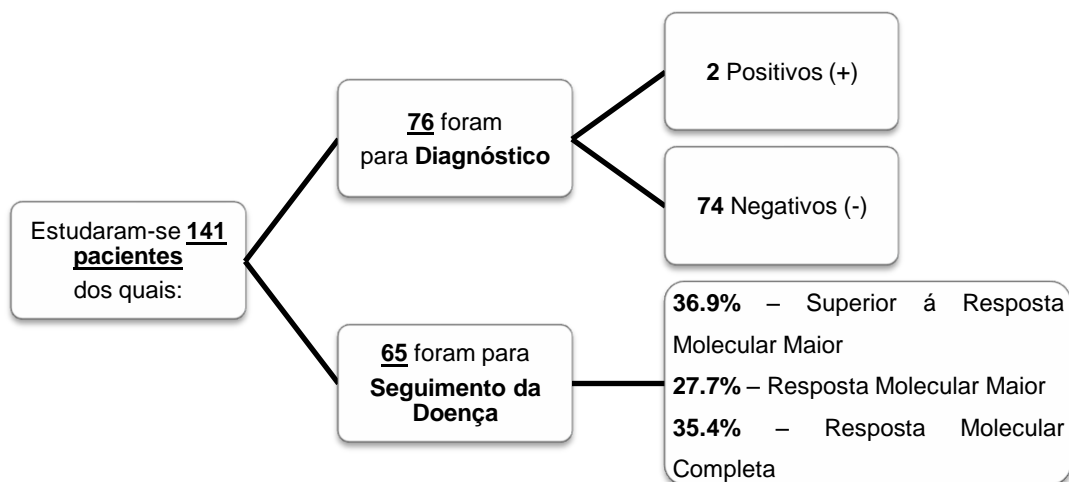
Durante o Ano de 2010, estudou-se o rearranjo BCR-ABL – p190 e p210, no qual obteve-se os seguintes resultados:

- BCR-ABL p190

Para o rearranjo BCR-ABL p190, estudaram-se 124 pacientes, dos quais todos foram negativos - ausência do reordenamento BCR-ABL p190.

- BCR-ABL p210

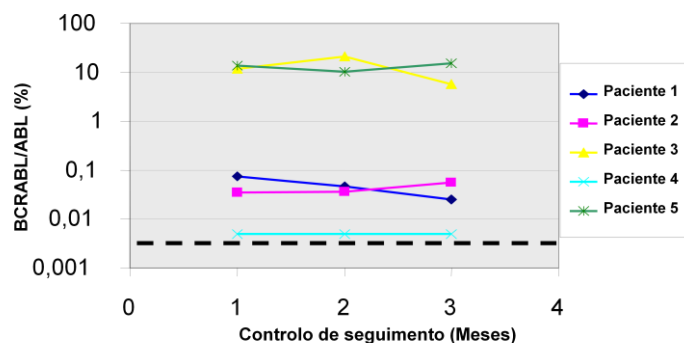
Para o rearranjo BCR-ABL p210, estudaram-se 141 pacientes, dos quais 76 chegaram para Diagnóstico do rearranjo BCR-ABL, e 65 para Seguimento da Doença. O Seguimento da Doença consiste numa quantificação do transcrito BCR-ABL p210 frente ao gene controlo ABL, aproximadamente a cada três meses. Como explicado na introdução deste trabalho, os pacientes com uma quantificação <0.05% encontram-se em Resposta Molecular Maior (RMM) e os que apresentam <0.005% - Resposta Molecular Completa (RMC), informando-se segundo estes critérios.



**Figura 4. Resultados obtidos para a detecção e quantificação de transcritos BCR-ABL p 210.**

Para o diagnóstico de LMC, durante o ano de 2010 apenas detectaram-se dois pacientes. As amostras que chegaram ao Laboratório para seguimento da doença revelaram que 63% estão em RMM ou RMC.

A Figura 5 demonstra a evolução da quantificação BCR-ABL p210, durante o ano 2010, em cinco pacientes que se encontram em tratamento para LMC.



**Figura 5.** Evolução da quantificação BCR-ABL p210, durante o ano 2010 em 5 pacientes em tratamento para a LMC.

Os pacientes 3 e 5 apresentaram uma quantificação do transcrito BCR-ABL superior a percentagem considerada RMM; os pacientes 1 e 2 encontram-se em RMM; o paciente 4 encontra-se em RMC. A linha descontinua representa o limite de detecção do equipamento LightCycler (aprox. 0.005 %).

Esta abordagem de monitorização permite demonstrar a eficácia do tratamento, tal como será explicitado na discussão.

## Discussão/Conclusão

As Neoplasias mielóides são caracterizadas por mutações somáticas e alterações epigenéticas em genes que são cruciais para a diferenciação hematopoiética, para vias de proliferação celular e sobrevivência das células. A heterogeneidade e a complexidade genética destes distúrbios é assustador, mas o progresso do conhecimento nos mecanismos patogénicos subjacentes da transformação mielóide, em conjunto com uma crescente disponibilidade de agentes que actuam sobre essas vias, oferece oportunidades únicas para o tratamento [26-29].

Aos pacientes com suspeita de PV, demonstrou-se uma implicação patogénica de genes mutados que têm relação com a actividade tirosina kinase [30].

Das amostras recebidas, durante o ano 2010, no departamento de Biologia Molecular para a detecção da mutação V617F, 22% apresenta a dita mutação pontual no gene Jak2. Esta observação significa que no cromossoma 9, no codão 617 em vez de estar presente uma valina, esta foi substituída por uma fenilalanina, de acordo com o previamente descrito por Passamonti et al [31].

Os sintomas observados pelo hematólogo – Leucocitose, Poliglobulia, Neutrofilia, Trombocitose e Trombocitemia Essencial – são fundamentais para a requisição da prova de detecção da mutação V617F, a qual permite um diagnóstico rápido de Policitemia Vera. A observação de uma percentagem de 22% de pacientes com aquela patologia, reforça a necessidade e relevância de diagnosticá-la com celeridade e eficácia.

O tratamento da Policitemia Vera passa fundamentalmente pela redução do número de glóbulos vermelhos através de flebotomias (procedimento similar a uma dádiva de sangue em que são removidos entre 350 a 500 ml de sangue total com reposição de soro fisiológico) e/ou de medicamentos que destroem os glóbulos vermelhos em excesso [5].

O aparecimento da mutação V617F no gene Jak2 estabelece-se como o *link* patogénico comum, e dos mais importantes dentro do grupo Síndromes Mieloproliferativas cromossoma Philadelphia negativos (Ph<sup>-</sup>): PV, TE e MI [32].

A expressão de Jak2 V617F Kinase origina activação e crescimento celular independentemente dos factores de crescimento e constitui um mecanismo patogénico da PV, TE e MI [31]. A demonstração da actividade da tirosina kinase constitutiva permitiu o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidores de Jak2 Kinase [31]. Os inibidores de Jak2 induzem respostas clinicamente relevantes uma grande proporção de pacientes com MPN's.

Devido a actividade Jak2 Kinase associada a outro tipo de patologias, tais como patologias auto-imunes e reumatológicas, o paradigma da inibição de Jak2 poderia traduzir-se em novas terapias para uma grande variedade de patologias humanas [33].

Relativamente ao rearranjo do gene BCR-ABL – translocação recíproca t (9;22) (q34;q11) que dá lugar a uma proteína tirosina-kinase que exerce uma acção importante nos mecanismos de adesão, apoptose e proliferação celular [32], apenas durante o ano 2010 diagnosticaram-se dois pacientes (BCR-ABL p210).

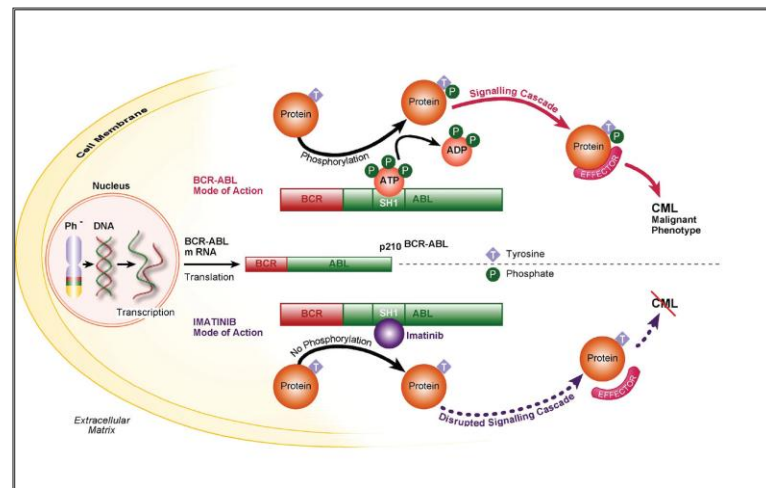
Os pacientes estudados para seguimento da LMC (65) um 36.9% apresentaram uma quantificação do gene transcrito BCR-ABL superior a 0.05%; 27.2% apresentaram RMM (<0.05%) e 35.4% RMC (<0.005%).

Como se pode observar na Figura 5, não houve grandes variações na quantificação BCR-ABL p210 durante as revisões efectuadas trimestralmente.

É significativo o facto de se observar um 36% que se mantém em RMC com o tratamento que estão a receber.

A introdução da droga, *imatinib* (nome comercial: Glivec) é considerada nos dias de hoje, uma abordagem terapêutica de referência no tratamento dos pacientes com LMC, pois está aprovado para o tratamento de primeira linha de pacientes adultos com LMC Ph + [35].

*Imatinib* tem funções semelhantes às da molécula de ATP [34]. A figura 6 compara o modo de acção do rearranjo BCR-ABL e do *Imatinib* na patogénese da LMC [34].



**Figura 6.** Comparação do modo de acção do rearranjo BCR-ABL e do *imatinib* na patogénese da LMC.

A característica primordial do *imatinib* é o seu grau de especificidade marcante para a ligação a molécula de ATP, originando efeitos sobre outras células - tirosina quinase [34].

No tratamento da LMC em fase crónica, o *imatinib* produz uma resposta superior e sustentável em relação ao INF $\alpha$ . Estudos recentes [34, 35] compararam o uso de *imatinib* e medicamentos convencionais usados no tratamento de pacientes recentemente diagnosticados com LMC.

As drogas convencionais incluindo INF $\alpha$  recombinante, e citarabina em doses baixas demonstraram taxas superiores em relação à resposta citogenética e mecanismos fisiológicos, resultando numa redução na quantidade de desacoplado disponível de *imatinib*, originando uma diminuição na qualidade dos níveis de *imatinib* para o efeito [35,36].

A resistência ao *imatinib* observa-se, entretanto, em alguns pacientes com LMC, especialmente naqueles que estão numa fase avançada da doença [37].

Actualmente está em estudo um novo tratamento, com *dasatinib* em pacientes com resistência ou intolerância ao *imatinib* em fase crónica, acelerada ou crise blástica fatal. Esta terapia tem demonstrado resultados significativos realçando-se mais em pacientes em fase crónica do que naqueles que se encontram em fase acelerada [37].

O futuro do tratamento da LMC poderá incorporar inibidores tirosina kinase mais eficazes como o *dasatinib* no tratamento inicial dos pacientes previamente diagnosticados. A capacidade do *dasatinib* promover rápidos e elevados índices de resposta poderá traduzir-se num aumento da sobrevivência dos indivíduos com LMC [37].

O diagnóstico dos SMC resulta complexo. O aparecimento de mutações em determinados genes ou a formação de genes de fusão que levam associados uma produção de proteínas com actividade tirosina quinase, foi permitindo a introdução de inibidores tirosina quinase como terapêutica dirigida a estas proteínas [31].

A rapidez e a fiabilidade do diagnóstico são factores chaves para o êxito do tratamento destas patologias [31]. Isso é, a evolução das Técnicas de Diagnóstico Molecular contribuíram de forma eficaz para a rapidez e fiabilidade dos resultados no diagnóstico dos Síndromes Mieloproliferativos Crónicos.

## Agradecimentos

Quero começar por agradecer à entidade que autorizou a realização do Projecto de Investigação inserido na Licenciatura de Análises Clínicas e Saúde Pública, no Departamento de Biologia Molecular – Laboratório *Unilabs* (Laboratório de Referência) – Presidente Sr. Don Daniel de Busturia, Administrador Delegado Sr. Don Tobias Fenster e em especial ao Director Operacional, Sr. Don Javier Goya Ramos.

Em seguida quero agradecer à Universidade Atlântica, na pessoa do Presidente do Conselho de Administração Executivo – Prof. Dr. Artur Torres Pereira.

De seguida quero de agradecer, de forma bastante especial à minha Orientadora Interna - Dra. Ana Jaleco e a minha Orientadora Externa - Dra. Mónica Herrera.

Não posso deixar de agradecer a minha Coordenadora de Curso Professora Dra. Raquel Mareco; Professora Dra. Isabel Oliveira (Professora de Estatística) e a Dra. Elisa Ramirez Mendonça (Orientadora dos Estágios de Análises Clínicas e Saúde Pública em Madrid).

## Referências Bibliográficas

1. Dameshek, W. (1951) Some speculations on the myeloproliferative síndromes. **Blood** 6: 372-375.
2. Tefferi, A; Thiele, J and Vardiman, JW. (2009) The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. **Cancer** 115: 3842-7.
3. Tefferi, A and Vardiman, JW. (2008) Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. **Leukemia** 22: 14-22.
4. Kaushansky, K. (2007) The chronic myeloproliferative disorders and mutacion of JAK2: Dameshek´s 54 year old speculation comes of age. **Best Pract Res Clin Haematol** 20(1): 5-12.
5. Baxter, EJ; Scott, LM; Campbell, PJ et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine Kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet** 365: 1054-1061.
6. Levine, EL; Wadleigh, M; Cools, J et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell** 7: 387-397.
7. James, C; Ugo, V; Le Couedic, JP et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. **Nature** 434: 1144-1148.
8. Kralovics, R; Passamonti, F; Buser, AC et al. (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N Engl J Med** 352: 1779-1790.
9. Tefferi, A; Gilliland, G. (2007) Oncogenes in Myeloproliferative Disorders. **Cell Cycle** 6: 5, 550-566.
10. Lens, D; Muxi, P.; Brugnini, A et al. (2007) Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. **Rev Med Urug** 23: 122-125.
11. Köhler, D; Dellweq, D. (2010) Polycytemia. **Dtsch Med Wochenschr** 135 (46):2300-3.
12. Guglielmelli, P; Vannucchi, A. (2010) Recent advances in diagnosis and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms. **Medicine Reports Ltd**, 2: 16.
13. Hellmnn, A. (2008) Myeloproliferative syndromes: diagnosis nd therapeutic options. **Pol Arch Med Wewn** 12: 756-760.
14. Haferlach, T; Bacher, U; Kern, W et al. (2008) The diagnosis of *BCR-ABL*-negative chronic myeloproliferative diseases (CMPD): a comprehensive approach base don morphology, cytogenetics, and molecular markers. **Ann Hematol** 87: 1-10.
15. Sánchez-Martín, M; Sánchez-García I. (2003) Inhibidores de BCR-ABL como un abordaje molecular de la leucemia mieloide crónica. **Rev Oncol** 4: Suppl 2.
16. Heisterkamp, N; Stepheson, JR; Groffen, J et al. (1983) Localization of the c-ABL oncogene adjacent to a translocation breakpoit in chronic myelocytic leukemia. **Nature** 306: 239 – 42.
17. Shtivelman, E; Lifschitz B; Gale RP et al. (1985) Fused transcript of ABL and BCR genes in chronic myelogenous leukaemia. **Nature**: 315550-4.
18. Lugo, TG; Pendergast, AM; Muller, AJ et al. (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-Abl oncogene products **Science** 247: 1079-82.
19. Hernández Sánchez, MC; Quiroga, G; Ulibarrena Redondo, C et al. (2008) Concurrent lymphoproliferative and myeloproliferative disorders in three patients. **Anales de Med. Interna** 25: 2.



20. Artigas, C; Melo, A; Roa, JC et al. (2002) Detection of BCR-ABL gene sequences using polymerase chain reaction reverse transcriptase in patients with leukemia. **Rev Méd Chile 130**: 623-630.
21. Baccarani, M; Sanglio, G; Goldman, J et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia. **Blood 108(6)**: 1809-1820.
22. Red nacional integral de cancro, directriz de prácticas clínicas em Oncologia para a leucemia mieloide crónica v.2. 2009.
23. Brandford, S; Cross, NC; Hochhaus, A. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. **Leukemia 20(11)**:1925-30.
24. Miller, TD; Farguharson, MH. (2010) Essential thrombocythaemia and its neurological complications. **Pract Neurol 10(4)**: 195-201.
25. Subirá, D; Font, P; Villalón, L et al. (2008) Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders. **Translational Research; 151**: 240-245.
26. White HE; Matejschuk P; Rigsby P et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. **Blood 25**: 116(22): e 111-7.
27. Mata, R; Subirá, D; García- Raso, A et al. (2007) JAK2 as a Molecular Marker in Myeloproliferative Diseases. **Bentham Science Publishers Ltd, 5**: 198-203.
28. Knoops, L; Hermans, C; Ferrant, A et al. (2008) Clinical implications of JAK2 mutations in myeloproliferative disorders. **Acta Clin Belg 63(2)**: 93-8.
29. Odenike, O; Thirman, MJ; Artz, AS et al (2011) Gene mutations, epigenetic dysregulation, and personalized therapy in myeloid neoplasia: are we there yet? **Semin Oncol 38(2)**:196-214.
30. Hernández Sánchez, M C; García Quiroga, H; Ulibarrena, C et al (2008) Coexistencia de Síndrome Lifoproliferativo Crónico y Síndrome Mieloproliferativo Crónico en tres pacientes. **An Med. Interna 25(2)**.
31. Passamonti, F; Maffioli, M; Caramazza, D et al (2011) Myeloproliferative neoplasms: From JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. **Oncotarget**.
32. Quintás-Cardama, A; Verstovsek, S (2011) New Jak2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms. **Expert Opin Investig Drugs 20(7)**:961-72.
33. Fullmer, A et al. (2011) New developments in the treatment of chronic myeloid leukemia and Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma 52 Suppl 1**: 81-91.
34. Frazer, R; Irvine, A; McMullin, M (2007) Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. **Ulster Med J 76(1)**: 8-17.
35. Von Budnoff, N; Peschel, C; Duyster, J (2003) Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (ST11571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. **Leukemia 17(5)**: 829-38.
36. Hochhaus, A; La Rosee, P (2004) Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. **Leukemia 18(8)**:1321-3.
37. Li, J; Xu, G; Yu, S et al (2011) Dasatinib treatment for imatinib resistant or intolerant patients with chronic myeloid leukaemia. **J Int Med Res 39(2)**: 337-47.