

Pesquisa Molecular das Mutações ITD e D835 do Gene FLT3: um Importante Valor Prognóstico para Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda

Vanessa Cristina de Oliveira, Jerusa Batistele Soares, Sabrina Guimarães Paiva,
Victor Cavalcanti Pardini, Alessandro Clayton de Souza Ferreira

Instituto Hermes Pardini - Departamento de Genética Humana

Resumo

Leucemia mielóide aguda (LMA) é um dos tipos mais comuns entre as malignidades hematológicas, afetando indivíduos de todas as idades. Cerca de 30% dos pacientes com LMA apresentam mutações somáticas no gene FLT3 nas células progenitoras hematopoiéticas. As principais mutações no gene FLT3 são as duplicações internas em tandem (ITD) e a mutação pontual D835, ambas instáveis, cujo efeito consiste na hiperativação do receptor tirosino quinase FLT3, ocasionando maior taxa de recaídas e menor sobrevida do paciente. Por este motivo, o screening molecular destas mutações em pacientes após o diagnóstico, durante a terapêutica e as recaídas, é um importante fator prognóstico para a LMA. O número de cópias dos alelos FLT3 mutados e o comprimento das ITD também relacionam-se ao perfil do prognóstico. As técnicas de biologia molecular permitem a identificação do genótipo FLT3 em pacientes leucêmicos, garantindo maior eficiência na monitorização terapêutica; principalmente ao se realizar a pesquisa molecular em amostras de sangue de medula óssea.

Palavras-chaves: FLT3, FLT3/ITD, FLT3/D835, prognóstico, Leucemia Mielóide Aguda

Summary

Molecular research of FLT3 gene ITD and d835 mutations: an important prognostic value for patients with Acute Myeloid Leukemia

Acute myeloid leukemia is one of the most common types among hematologic malignancies, affecting individuals of all ages. About 30% of patients with AML present somatic mutations in FLT3 gene in hematopoietic progenitor cells. Major mutations in the FLT3 gene are internal tandem duplications (ITD) and D835 punctual mutation, both unstable, whose effect consists in FLT3 kinase tyrosine receptor hyperactivation causing a higher rate of relapse and patient's reduced survival. Therefore, these mutations molecular screening in patients after diagnosis, during therapy and relapses, is an important prognostic factor for AML. The number of copies of FLT3 changed alleles and the ITD length are also related to the prognosis profile. Molecular biology techniques allow the FLT3 genotype identification in leukemic patients ensuring greater efficiency in therapeutic monitoring, especially when performing molecular research in bone marrow blood samples.

Keywords: FLT3, FLT3/ITD, FLT3/D835, prognostic, Acute Myeloid Leukemia

Introdução

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) é um receptor tirosino quinase, com função bem conhe-

cida na sobrevida, proliferação e diferenciação celular (1, 2). É expresso normalmente em células progenitoras hematopoiéticas, o que não ocorre nas células hema-

topoiéticas diferenciadas. Por sua vez, a linhagem B e as leucemias mielóides agudas (LMA) apresentam superexpressão da proteína FLT3, o que também pode ser

encontrado em casos de leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielóide crônica (LMC) e síndromes mielodisplásicas (3 a 5%) (1).

Cerca de 30% dos pacientes com LMA apresentam mutações no gene FLT3, em caráter somático, ou seja, as mutações podem ocorrer em subclones das células progenitoras hematopoiéticas, gerando uma miscelânea de células leucêmicas sem mutação e células leucêmicas com alelos FLT3 mutados em diferentes proporções, conforme o grau de maturação do subclone onde tenha(m) sido originada(s) a(s) mutação(s) no gene FLT3 (1).

Os dois tipos principais de mutações no gene FLT3, localizado no cromossomo 13 (3), são duplicações internas em tandem (ITD) e a mutação pontual D835 (1, 2). Ambas resultam em ativação constitutiva do receptor tirosino quinase, mesmo na ausência de ligantes (1), o que contribui para o aumento da proliferação celular e redução da apoptose e, conseqüentemente, maior taxa de recaídas e menor sobrevida do paciente (2, 4).

As FLT3/ITD são duplicações de 3 a 400 bp¹ no exon 11, (3) sem mudança de matriz de leitura, que afetam cerca de 23% dos pacientes LMA, (1) principalmente quando há alta contagem absoluta de leucócitos periféricos e de blastos na medula óssea, (5) e LMA tipo FAB M0 e M5. (2, 4) Pacientes adultos com t(15;17) demonstram ter a maior prevalência de FLT3/ITD. (5) Apesar de menos freqüente na infância (cerca de 15%), sua presença indica pior prognóstico em pacientes adultos e pediátricos; o que não é unânime para todos os casos de pacientes FLT3/ITD. Há evidências que ITD maiores representam maior des-

vantagem frente às ITD menores. Adicionalmente, o prognóstico pode ser consideravelmente agravado quando ocorre perda do alelo selvagem do FLT3. (1) O maior nível de cópias mutadas de FLT3 é significativamente relacionado ao risco de recaída e à agressividade da patologia, enquanto um nível baixo de mutantes ainda apresenta significativo mau prognóstico em relação aos indivíduos FLT3 selvagem. (2, 6) Isto indica que a quantificação dos transcritos mutados pode vir a ser de grande importância na monitorização terapêutica das leucemias. (7)

A mutação pontual FLT3/D835, situada no exon 20, (2) está presente em aproximadamente 8 a 12% dos pacientes LMA. (1) A menor sobrevida relacionada a FLT3/D835 já foi estimada em até três anos em comparação a pacientes LMA com genótipo FLT3/D835 selvagem, independente do número de blastos na medula óssea e estágio de NPM1 (8).

As duas mutações são consideradas instáveis, visto que a porcentagem de alelos mutados do gene FLT3 varia durante o curso da doença, inclusive no tratamento e na(s) recaída(s); (2, 4) além do próprio comprimento da ITD diferir em um mesmo paciente, nas várias etapas da LMA. (2) O comprimento da ITD varia, mas o fragmento duplicado sempre mantém a matriz de leitura da sequência de DNA. (3) Também há relatos de pacientes inicialmente FLT3/ITD negativos, mas positivos nas recaídas. Isso fornece indícios da provável existência de mutações alternativas no gene FLT3 ou em outros genes (2, 9).

Mediante esses conhecimentos, têm surgido novas terapias para LMA, baseadas na presença ou ausência das mutações no gene FLT3. Estudos recentes mostraram que o medicamento AG1296 provoca maior citotoxicidade em portadores de mutações FLT3 (1). Além disso, nos casos de resistência

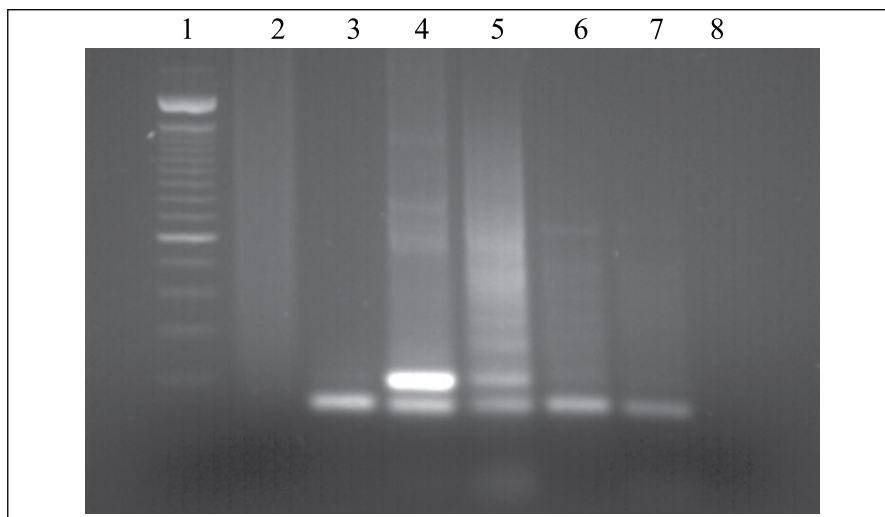


Figura 1. Mutação FLT3/D835: eletroforese em gel de agarose após PCR-RFLP. Representação das canaletas: 1 – Peso molecular 100pb; 2 – amostra não amplificada; 3, 6 e 7 – ausência de mutação; 4 e 5 – presença de mutação e 8 – branco da reação

das células leucêmicas à terapia, é fundamental o acompanhamento da persistência ou não dos clones FLT3/ITD, uma vez que as cópias resistentes à quimioterapia podem apresentar vantagem proliferativa. Assim, este diagnóstico indica a intensidade do tratamento (2, 4).

A pesquisa molecular das mutações FLT3/ITD e FL3/D835 é de imensa relevância, sendo indicada em pacientes adultos e crianças com leucemia, principalmente, leucemia mielóide aguda; (1) lembrando de não desprezá-las nos casos de leucemias FAB M0 a M5 (nem todos os trabalhos mostram predominância de um determinado tipo) (3) e independente dos resultados de cariótipo, (4) ressaltando que geralmente FLT3/ITD é mais freqüente em pacientes

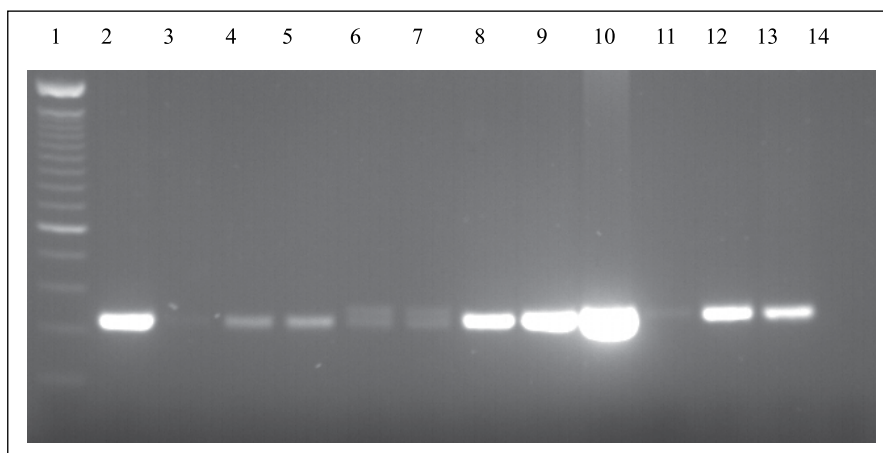


Figura 2. Mutação FLT3/ITD: eletroforese em gel de agarose após PCR. Representação das canaletas: 1 – peso molecular 100pb; 3 e 11 – amostras não amplificadas; 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12 e 13 – ausência de mutação; 6 e 7 – presença de mutação e 14 – branco da reação

com cariótipo normal em relação àqueles com alterações citogenéticas. (3) A análise genética é de grande valor na fase logo após o

diagnóstico, durante o tratamento e em possíveis recaídas, sempre considerando o fato da instabilidade de ambas alterações genéticas.

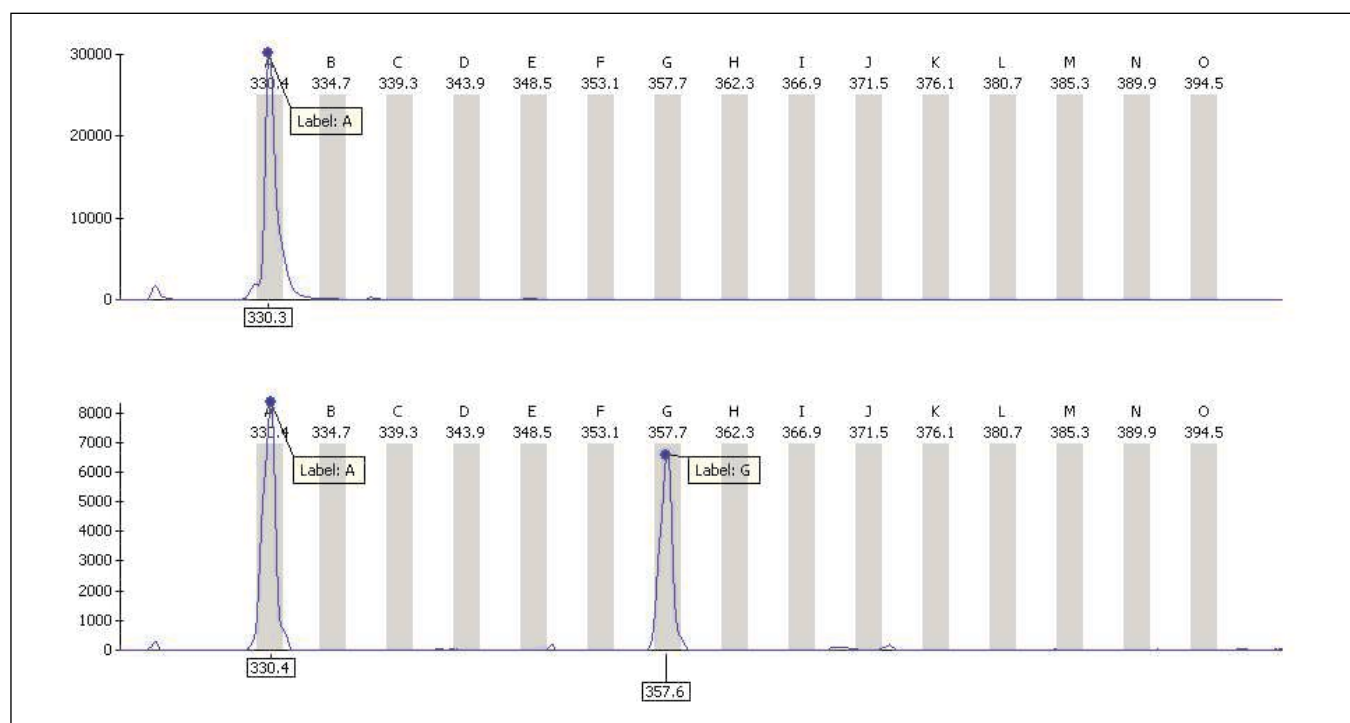


Figura 3. Mutação FLT3/ITD: eletroferograma com fluorescência FAM obtida em sequenciador automático Megabace 1000 (Amersham Biosciences), onde 3A mostra amostra com ausência de mutação e 3B apresenta amostra com presença de ITD. A diferença de peso molecular entre o pico selvagem (330pb) e o pico FLT3/ITD (357pb) define o comprimento da inserção em tandem (27pb)

O ideal é que sejam analisadas as duas mutações FLT3/ITD e FLT3/D835, a fim de abranger a maior porcentagem de pacientes que possam ter um pior prognóstico devido a estas mutações somáticas do FLT3. O resultado deve ser discriminado como ausência ou presença de cada uma destas duas mutações. Geralmente, a presença de qualquer uma das mutações é acompanhada da existência do alelo selvagem, pois somente alguns clones sofrem a mutagênese. Portanto, o achado de um paciente homozigoto mutante para estas mutações revela perda de heterozigose no cromossomo 13, na região do gene FLT3 (3).

Tecnicamente, é recomendado o uso de DNA para o estudo molecular, uma vez que o RNA pode degradar parcial e rapidamente. Deve-se dar preferência para a pesquisa amostras de sangue de medula óssea em EDTA, a fim de aumentar a sensibilidade do teste, uma vez que o sangue periférico

pode conter um número muito baixo de blastos, principalmente após tratamento quimioterápico. Apesar do risco de resultados falsos-negativos, o uso do sangue periférico somente é recomendado em casos peculiares, por exemplo, nos quais a punção medular representa risco ao paciente. No entanto, a punção medular não deve restringir significativamente a realização do exame genético, visto que indivíduos com leucemia já são submetidos a este procedimento para outras análises pertinentes, como mielograma, imunofenotipagem e cariótipo de medula óssea.

O estudo da mutação FLT3/D835 pode ser realizado pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP) e posterior eletroforese em agarose para separação dos fragmentos (Figura 1). Por sua vez, a mutação FLT3/ITD é analisada por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose (Figura 2) ou

PCR fluorescente acompanhada de eletroforese capilar em aparelho seqüenciador (Figura 3). Além da maior sensibilidade, por permitir discriminar diferenças mínimas de peso molecular (neste caso de três nucleotídeos), esta última possibilita determinar o comprimento exato da ITD. Isso a torna vantajosa em relação à primeira, uma vez que este dado tem relevante significado prognóstico, diante do fato que ITD maiores representam pior prognóstico frente às ITD menores.

Somando estas análises ao estudo molecular das mutações FLT3/ITD e FLT3/D835, o paciente pode ser monitorado mais sensivelmente e vir a apresentar menor taxa de recaídas e maior sobrevida livre de leucemias.

Correspondências para:

Alessandro Clayton de S. Ferreira
dna9@labhpardini.com.br

Referências Bibliográficas

1. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2006; 178-184.
2. Tiesmeier J et al. Evolution of FLT3-ITD and D835 activating point mutations in relapsing acute myeloid leukemia and response to salvage therapy. *Leukemia Research, Elsevier* 2004; 28: 1069-1074.
3. Meshinchi S et al. Prevalence and prognostic significance of FLT3 internal duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(1): 89-94.
4. Colovic N et al. Importance of early detection and follow-up of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2007 Oct; 86(10): 741-7.
5. Lee JN et al. Prevalence of FLT3 Internal Tandem Duplication in Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Korean J Lab Med.* 2007 Aug; 27(4):237-43.
6. Gale RE et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007 Oct 23.
7. Mrózek K et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood.* 2007 Jan 15; 109(2):431-48.
8. Whitman SP et al. FLT3D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* 2007 Oct.
9. Scholl S et al. Clinical impact of nucleophosmin mutations and FLT3 internal tandem duplications in patients older than 60 years with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 2007 Dec.