

PESQUISA MOLECULAR DO GENE FLT3: PROGNÓSTICO DE LMA

FLT3 (FMS-like tyrosina kinase 3) é um receptor tirosino quinase, com função bem conhecida na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Por sua vez, a linhagem B e as leucemias mielóides agudas (LMA) apresentam super-expressão 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%). 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 mistura 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.

Os dois tipos principais de mutações no gene FLT3, localizado no cromossomo 13, são as duplicações internas em tandem (ITD) e a mutação pontual D835. Ambas contribuem para o aumento da proliferação celular e redução da apoptose e, conseqüentemente, para a maior taxa de recaídas e menor sobrevivência do paciente.

Duplicações internas em tandem (ITD)

As FLT3/ITD são duplicações de 3 a 400 bp no exon 11, sem mudança de matriz de leitura, que afetam cerca de 23% dos pacientes LMA, principalmente quando há alta contagem absoluta de leucócitos periféricos e de blastos na medula óssea, e LMA tipo FAB M0 e M5. Pacientes adultos com t(15;17) demonstram ter a maior prevalência de FLT3/ITD. Há evidências que ITD maiores representam maior desvantagem frente às ITD menores. 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.

Mutação pontual D835

A mutação pontual FLT3/D835, situada no exon 20, está presente em aproximadamente 8 a 12% dos pacientes LMA. A menor sobrevivência relacionada a FLT3/D835 já foi estimada em até 3 anos em comparação a pacientes LMA com genótipo FLT3/D835 selvagem, independente do número de blastos na medula óssea.

Importância do estudo molecular do gene FLT3

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. Além disso, nos casos de resistência 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.

A pesquisa molecular das mutações FLT3/ITD e FLT3/D835 é de imensa relevância, sendo indicada em pacientes adultos e crianças com leucemia, principalmente, leucemia mielóide aguda, lembrando de não desprezá-las nos casos de leucemias FAB M0 a M5 e independente dos resultados de cariótipo, ressaltando que geralmente FLT3/ITD é mais freqüente em pacientes com cariótipo normal em relação àqueles com alterações citogenéticas.

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. 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.

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.

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); além do próprio comprimento da ITD diferir em um mesmo paciente, nas várias etapas da LMA. 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.

Departamento de Genética Humana

Técnica

O estudo da mutação FLT3/D835 é realizado pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP). Por sua vez, a mutação FLT3/ITD é realizada por PCR fluorescente acompanhada de eletroforese capilar em aparelho sequenciador. Essa técnica possibilita determinar o comprimento exato da ITD, fato este de relevante significado prognóstico, diante do fato que ITD maiores representam pior prognóstico frente às ITD menores.

Amostra

Deve-se dar preferência para a pesquisa de 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 falso 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.

Resumindo:

Preferencialmente sangue de medula óssea em EDTA – 3mL

Sangue total em EDTA: Casos especiais após consulta com o setor – 3mL

Conservação para envio

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

Tempo de liberação

10 dias úteis após as 18:30h

Referências bibliográficas

1. SMALL, D. FT3 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 f 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.