

LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA – GENÉTICA MOLECULAR E MUTAÇÕES - REVISÃO

Luana Carolina Stonoga¹, Elenice Stroparo²

Resumo

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia que afeta os progenitores mielóides, sendo alvo de diversos estudos na área da citogenética, é uma doença heterogênea pois, conforme a mutação envolvida altera totalmente o prognóstico e seu tratamento, este fato fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2008 criasse uma nova classificação para a doença baseada nos diferentes perfis genéticos presentes, uma vez que a classificação do grupo franco-americano britânico (FAB) era fundamentado apenas na morfologia e citoquímica das células e já não expressava mais a realidade da doença. As principais técnicas utilizadas no estudo e diagnóstico das mutações genéticas são as de bandeamento G e a hibridação fluorescente *in situ* (FISH). As alterações genéticas encontradas na LMA podem envolver uma grande quantidade de genes, como deleções, inversões e translocações, que podem ser observados no cariótipo, mas também podem ocorrer em apenas alguns genes, ou de maneira simultânea. Os genes mais relevantes estudados e que apresentam grande importância na LMA são o NPM1, CEBPA e o FLT3. O NPM1 é a mutação mais comum encontrada e pode ou não estar associada a outras mutações e em geral apresenta um bom prognóstico. O CEBPA também é associado a um bom prognóstico da doença, porém é encontrado em apenas 10% dos casos de LMA. A mutação mais importante é a FLT3, pois é a que apresenta pior prognóstico sendo alvo de um amplo estudo citogenético e principalmente no tratamento baseado na inibição do gene. A partir de estudos dos RNAs, com as tecnologias de sequenciamento genético, é esperado mais avanços nessa área.

Palavras chave: Leucemia mieloide aguda. Citogenética. NPM1 e FLT3.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a neoplasm that affects the myeloid progenitors and is the target of a study on the area of cytogenetics. It is a heterogeneous disease because, as a mutation changes the prognosis and its treatment completely, this fact has caused the Organization World Health Organization in 2008 creates a new classification for the disease based on the different genetic forms present, since a series of the British-French group (FAB) was based only on the morphology and cytochemistry of the cells and no longer expressed a reality of the disease. The main techniques used in the study and diagnosis of genetic mutations are G-band and fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetic alterations can be a large number of genes, such as deletions, inversions and translocations, which can be observed in the karyotype, but may also occur in only a few genes, or simultaneously. The most important genes that are important in AML are NPM1, CEBPA and FLT3. NPM1 is a common mutation found and may not be associated with other mutations and generally has a good prognosis. CEBPA is also associated with a good prognosis of the disease, but is found in only 10% of cases of AML. The most important mutation is FLT3, since it is one of the factors that is most likely to be the subject of a large study on the subject. From studies of RNAs, with the technologies of genetic sequencing, the advance in this area is faster.

Keywords: Acute myeloid leucemia. Cytogenetics. NPM1 and FLT3.

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR.

² Farmacêutica-Bioquímica, Professora da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. Endereço eletrônico para correspondência: Luana Carolina Stonoga, luanasto@hotmail.com e Elenice Stroparo, elenicestroparo@yahoo.com.br

Introdução

As leucemias são neoplasias malignas que afetam as células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea que posteriormente atingem a circulação periférica, podendo atingir outros tecidos. As mutações ocorridas no DNA das células neoplásicas conferem a elas uma alta taxa de proliferação celular, como a multiplicação ocorre de maneira muito rápida, as células não adquirem função e há uma redução na produção de outras células sanguíneas (LICÍNIO e SILVA, 2010).

A leucemia mieloide aguda (LMA), é uma doença heterogênea, pois apresenta diversos fatores clínicos, morfológicos e moleculares. Em 2008 a Organização Mundial da Saúde (OMS) mudou o modo de classificação da LMA, que foi atualizado em 2016 baseando-se nos avanços citogenéticos e moleculares (HELMAN *et al.*, 2011; ARBER *et al.*, 2016).

Foi uma das primeiras neoplasias a ter o seu perfil genético amplamente estudado, teve o seu primeiro genoma publicado em 2008. Posteriormente diversas pesquisas foram realizadas que levaram a conclusão de que a doença é dinâmica e complexa, podendo ter inúmeras mutações simultaneamente, processos de evolução da doença e clones concorrentes que podem coexistir (BULLINGER, DÖHNER e DÖHNER, 2017).

Técnicas de citogenética convencional (CG) e hibridização *in situ* (FISH) identificam anormalidades genéticas em cerca de 50% a 60% dos casos, classificando os prognósticos em favorável, intermediário e desfavorável. O restante é representado por 40% a 50% não apresentam alterações no cariótipo, mas carregam anomalias moleculares (LIN e FALINI, 2015).

O tratamento para LMA de prognóstico favorável consiste basicamente em quimioterapia padrão, já as de prognóstico não favorável são submetidos a um transplante alogênico de células tronco. Em paciente com prognóstico intermediário há uma dificuldade em determinar o melhor tratamento para a doença. As mutações NPM1 e CEBPA bialélica em um cariótipo normal mudam o prognóstico de intermediário para favorável, já a presença da mutação FTL3 mudam o prognóstico para desfavorável (YOHE, 2015).

Com a evolução tecnológica nas análises laboratoriais, a citogenética se mostrou importante para avaliação e classificação das leucemias. Por isso o seguinte trabalho foi realizado para demonstrar a importância da detecção das mutações NPM1, FTL3 e CEBPA e a sua influência na evolução, prognóstico e tratamento da LMA.

Método

Este trabalho consiste em uma revisão bibliográfica de caráter descritivo, fundamentado em leitura de publicações científicas em que foram utilizados como base de dados e pesquisa SCIELO, PUBMED, LILACS, com as palavras chaves: leucemia mieloide aguda, NPM1, FTL3 e citogenética. O período da pesquisa bibliográfica foi realizado entre junho a novembro de 2018, esta revisão contém trabalhos dos últimos oito anos.

Discussão

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é neoplasia caracterizada pela proliferação excessiva e diferenciação anormal das células precursoras mieloides (blastos) na medula óssea, pode ocorrer em decorrência de algum tratamento prévio como, por exemplo, quimioterapia ou radioterapia, mas a maioria dos casos aparecem como uma nova doença em indivíduos saudáveis. Com o aumento da população de blastos na medula óssea, essas células migram o sangue periférico e raramente para outros tecidos (KOUCHKOVSKY e ABDUL-HAY, 2016).

As manifestações clínicas geralmente encontradas em LMA incluem: fadiga, ataxia e perda de peso que são os sintomas mais comuns em pacientes portadores da doença. O diagnóstico inicial é feito a partir do hemograma que avalia as células em sangue periférico, onde grande parte apresenta leucocitose, com anemia e trombocitopenia (KOUCHKOVSKY e ABDUL-HAY, 2016).

Para caracterizar inicialmente a doença é necessário a identificação de $\geq 20\%$ de blastos em sangue periférico ou na medula óssea, porém em com t (8; 21) (q22; q22), inv (16) (p13.1; q22) ou t (16; 16) (p13.1; q22) e t (15; 17) (q22; q12) são consideradas LMA sem levar em consideração a contagem de blastos. A morfologia dos blastos varia de acordo com a alteração genética envolvida na leucemia como, por exemplo, em t(8;21) apresentam grânulos mais basofílicos com tamanho aumentado, clareamento paranuclear, bastonetes de Auer grandes e finos frequentemente encontrados, podendo ocorrer eosinofilia. Em t(15;17) é conhecida como leucemia promielocítica aguda, pois apresenta promielócitos anormais cujo núcleo tem característica bilobada ou recuada com citoplasma moderado e grande quantidade de grânulos com presença de “fagot cells” (bastonetes de Auer em feixes), e a inv(16) apresenta blastos mielomonocíticos com eosinofilia em todos os estágios maturativos (WEINBERG *et al.*, 2017)

Em 1976 o grupo franco-americano britânico (FAB) estabeleceu a primeira classificação de leucemia mielóide aguda, subdividindo em oito subtipos que são: leucemia mielóide aguda sem diferenciação (M0), leucemia mielóide aguda com diferenciação mínima (M1), leucemia mielóide aguda com diferenciação (M2), leucemia promielocítica aguda hipergranular ou típica (M3), leucemia promielocítica aguda hipogranular (M3v), leucemia mielomonocítica aguda (M4), leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia na medula óssea (M4v), leucemia monocítica aguda (M5), leucemia eritróide aguda (eritroleucemia)(M6) e leucemia Megacariocítica Aguda (M7). A classificação da FAB baseia-se na análise morfológica das células presentes na medula óssea ou distensão sanguínea e a sua reatividade a histoquímica com mieloperoxidase, Sudan *black* e esterases inespecíficas α -naftil acetato e naftil butirato, mais tarde foram acrescentados a classificação marcadores citoplasmáticos determinados por citometria de fluxo (LAGUNA-RANGEL *et al.*, 2017).

Porém, a classificação apresentava diversidades genéticas e clínicas, com isso a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, criou uma nova classificação baseada no histórico do paciente, morfologia das células e se há presença ou ausência de anormalidades genéticas, com isso a

categorização dos subgrupos de LMA tornou-se muito diferente da proposta pela FAB. Se dividindo nos seguintes subgrupos: LMA com anormalidades genéticas recorrentes, leucemia mielóide aguda com t (8; 21) (q22; q22); RUNX1-RUNX1T1, leucemia mielóide aguda com inv (16) (p13.1q22) ou t (16; 16) (p13.1; q22); CBFMB-MYH11, leucemia promielocítica aguda com t (15; 17) (q22; q12); PML-RARA, leucemia mielóide aguda com t (9; 11) (p22; q23); MLLT3-MLL, leucemia mielóide aguda com t (6; 9) (p23; q34); DEK-NUP214, leucemia mielóide aguda com inv (3) (q21q26.2) ou t (3; 3) (q21; q26.2); RPN1-EVI1, leucemia mielóide aguda (megacarioblástica) com t (1; 22) (p13; q13); RBM15-MKL1, leucemia mielóide aguda com mutação NPM1, leucemia mielóide aguda com CEBPA mutado, leucemia mielóide aguda (LMA) com alterações relacionadas à mielodisplasia, neoplasias mielóides relacionadas à terapia, leucemia mielóide aguda, SOE, leucemia mielóide aguda com diferenciação mínima, leucemia mielóide aguda sem maturação, leucemia mielóide aguda com maturação, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monoblástica e monocítica aguda, leucemia eritróide aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia basofílica aguda e panimielose aguda com mielofibrose (LAGUNA- RANGEL *et al.*, 2017; YOHE, 2015).

Algumas anormalidades genéticas são utilizadas como prognóstico para LMA, entre elas a maioria são rearranjos cromossômicos ou grandes deleções, que podem caracterizar prognósticos como sendo favoráveis, intermediário ou desfavorável. Classicamente mutações de t (15;17) em leucemia promielocítica aguda e inv (16) / t (16; 16) ou t (8; 21) em leucemias do fator de ligação central apresentam um bom prognóstico. Já pessoas que apresentam citogenética normal, t (9;11) e isoladas +8 tem um prognóstico intermediário. O prognóstico é considerado desfavorável quando o cariótipo se apresenta monossômico ou complexo, em deleções dos cromossomos 5 ou 7 e em alguns rearranjos cromossômicos específicos (YOHE, 2017).

As técnicas citogenéticas de bandeamento cromossômico e hibridação fluorescente *in situ* (FISH) são as mais utilizadas para diagnóstico de anormalidades genéticas. Foram utilizados inicialmente em hematologia na pesquisa em sangue periférico, devido a dificuldade na pesquisa em tumores sólidos, porém com a evolução das técnicas, atualmente pode ser realizada em qualquer tecido. O bandeamento cromossômico é a técnica mais tradicional utilizada, o primeiro método utilizado em cromossomos humanos para a visualização de um padrão de bandas, foi o bandeamento Q e posteriormente o bandeamento G. O bandeamento G utiliza tripsina e coloração por Giemsa, no momento é a técnica mais utilizada para detectar perdas ou ganhos de segmentos e rearranjos dentro ou entre cromossomo. Entretanto o método possui limitações como a contagem de bandas entre 400 a 500 bandas por genoma haploide, qualidade e resolução óptica do microscópio e complexidade do empacotamento DNA em cromossomos e a qualidade da preparação da metáfase (RIEGEL, 2014).

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) surgiu como alternativa para as limitações do bandeamento e para localizar sequências específicas de ácidos nucléicos na célula ou no cromossomo. A técnica de FISH, pode ser direta, que consiste em marcar os genes pesquisados através da hibridização de sondas de DNA marcadas com fluorocromos e a indireta utiliza uma

molécula intermediária incorporada na sonda. Como FISH permite a localização de genes em níveis submicroscópicos, ou a identificação de mais de uma sequência de nucleotídeos com a utilização de diferentes cores ou combinação de cores de fluorocromos, o que tornou o método amplamente utilizado tanto no laboratório clínico quanto em pesquisa (RIEGEL, 2014).

De acordo com a classificação da OMS de 2008 os genes NPM1, CEBPA e o FLT3-ITD são os genes mais encontrados na LMA. Em 2010 a *European LeukemiaNet* (ELN) propôs que a LMA com mutações NPM1, FLT3-ITD do tipo selvagem e CEBPA estão presentes no grupo de baixo risco cujo o tratamento é geralmente em quimioterapia, já a mutação FLT3-ITD com ou sem a presença do gene NPM1 estão classificados no grupo de risco intermediário, para esses pacientes ou pacientes de alto risco podem necessitar de transplante alogênico de células-tronco (TCT). Além dessas mutações, outras também foram adicionadas a lista de mutações mais comuns são eles: DNMT3A, TET2, IDH1 / 2, ASXL1, RUNX1 e PTPN11, dentre eles alguns são consideradas mutações iniciadoras e outras são mutações secundárias que ocorrem com a evolução da doença (LIN e FALINI, 2015).

A mutação mais comum é a do gene NPM1, sendo encontrada em cerca de 30% dos pacientes com LMA. O gene está localizado no cromossomo 5q35 e codifica uma fosfoproteína nucleolar que exerce função no núcleo e no citoplasma auxiliando na biogênese dos ribossomos e transporte de partículas pré-ribossômicas, na duplicação do centrômero durante a mitose, a proliferação celular e na apoptose. A mutação ocorre em cerca de 85% dos casos por uma duplicação de quatro pares de bases no éxon 12 na extremidade C terminal do gene, porém também podem ocorrer inserções de outros quatro pares de bases diferentes na mesma região (YOHE, 2017; VELLOSO, 2011).

Em grande parte dos casos de LMA com mutação NPM1 apresentam características fenotípicas com características morfológicas mielomonocíticas ou monocíticas e com imunofenotipagem negativa para CD34, há relatos de paciente com imunofenotipagem positiva para CD34, mas que apresentaram uma forma mais agressiva da doença (LIN e FALINI, 2015).

A expressão de NPM1 pode coexistir com outras mutações genéticas como FLT3, DNMT3A e IDH e mais raramente com os genes BCOR, ou CEBPA. A coexistência de genes tem grande representatividade no prognóstico da doença, por exemplo, LMA com presença de NPM1, cariótipo normal e ausência do FLT3-ITD tem um prognóstico favorável. Mas a presença do gene FLT3-ITD evolui negativamente o prognóstico da doença, dependendo da carga alélica do gene (YOHE, 2017).

O gene CEBPA codifica o fator diferenciação dos granulócitos, quando ocorre alguma mutação no gene a diferenciação das células é falha. A mutação é encontrada em aproximadamente 10% dos casos de LMA, sendo que desse mais da metade é causada pelo CEBPA bialélico, que consiste em uma mutação em ambos os domínios N e C-terminal. A presença da mutação associada ou não a outros genes como GATA2, NRAS, WT e CSF3R estão relacionadas a um prognóstico favorável (LAGUNAS- RANGEL *et al.*, 2017; BULLINGER, DÖHNER e DÖHNER, 2017).

Outro importante gene relacionado a LMA é o gene tirosina quinase 3 (FLT3), possui duas principais mutações, as duplicações tandem internas (ITD) e a mutações no domínio da tirosina

quinase (TKD), as duas formas ativam uma cascata de sinalização que inibem a apoptose e estimulam a proliferação celular (ASSI e RAVANDI, 2017).

O FLT3 – ITD é a forma com o pior prognóstico em pacientes que apresentam citogenética normal, pois diminuem a sobrevida e aumentam o risco de recaída da doença, quando tratados com quimioterapia convencional. É encontrada em cariótipos normais com t (15; 17) (q22; q12) [PML-RARA] e t (6; 9) (p23; q34) [DEK-NUP214] e associada também a outras mutações como NPM1 e DNMT3 (LAGUNAS- RANGEL *et al.*, 2017).

Como a mutação FLT3 – ITD é uma das mais prevalentes na LMA por conjuntamente possuir um pior prognóstico, houve um maior aprofundamento no estudo de moléculas inibidoras do gene (FLT3- TKIs). As moléculas TKIs inibem a fosforilação da proteína competindo com o sítio de ligação do ATP. O tratamento vem sendo alvo de estudos, porém os resultados apresentados ainda não foram satisfatórios, pois a melhora clínica foi parcial ou transitória com duração de 3 a 6 meses. O fármaco apresentou farmacocinética inadequada, pelo FLT3 limitando a inibição do alvo e uma série de eventos adversos prejudicaram o tratamento, além disso mutações pontuais no gene podem inibir a ação do medicamento (ASSI e RAVANDI, 2017).

O principal tratamento utilizado na LMA é a quimioterapia de indução intensiva cujo objetivo é alcançar a remissão morfológica completa (CR) que se define quando o número de blastos <5% em aspirado de medula óssea em uma contagem ≥ 200 células nucleadas sem blastos com bastonetes de Auer ou persistência da doença extramedular, contagem absoluta de neutrófilos $>1000/\mu\text{l}$ e plaquetas superiores a $100.000/\mu\text{l}$. Em pacientes adultos jovens e idosos aptos (geralmente portadores do gene NPM1) e tratamento é padrão com antraciclina e citarabina (SAULTZ e GARZON, 2016).

Novas terapias vêm surgindo como alternativa, visando a melhor resposta do paciente diante das alterações genéticas que podem ocorrer na LMA, o gene mutado de maior importância para o prognóstico e tratamento da doença é o FLT3, que é tratado com inibidores de FLT3-ITD. Os inibidores de primeira geração são: midostaurin, lestaurtinib, tandutinib sunitinib e sorafenib, esses medicamentos quando utilizados de maneira única apresentam atividade anti-leucêmica limitada, reduzindo de maneira transitória o número de blastos no sangue periférico e em medula óssea, além de um aumento na toxicidade. Já os inibidores de segunda geração que incluem o quizartinibe e o crenolanibe estão ainda em fase de testes para avaliar a sua real eficácia, mas já demonstraram uma maior taxa de redução de blastos do que os da primeira geração (KOUCHKOVSKY e ABDUL-HAY, 2016; SAULTZ e GARZON, 2016).

Conclusão

A Leucemia mielóide aguda foi uma das primeiras neoplasias estudadas por ser amplamente heterogênea, apresentar características clínicas distintas e respostas específicas a tratamentos. Com a evolução da tecnologia observou-se que os genes envolvidos na leucemogênese influenciavam

não só a clínica do paciente, mas como também o tratamento que deveria ser abordado, com isso a classificação adotada precisou ser revista e ajustada. Os genes, principalmente do NPM1, CEBPA e FLT3 são os mais abordados em estudos por sua grande influência no prognóstico da doença. A partir dessas novas tecnologias de sequenciamento genético, estudo dos RNAs podemos esperar ainda mais avanços nessa área.

O biomédico tem um papel essencial para os avanços na pesquisa e diagnóstico diferencial da LMA, pois possui um amplo conhecimento e domínio das técnicas nas áreas de hematologia e genética, e com isso consegue associar as duas áreas e contribuir para a evolução das pesquisas na área e um diagnóstico e tratamentos mais precisos e corretos.

Referências

- ARBER, D.A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M.J.; BEAU, M.M.L.; BLOOMFIELD, C.D.; CAZZOLA, M.; VARDIMAN, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood Journals*, nº 20, volume 127, pg 2391- 2405, 2016.
- ASSI, R.; RAVANDI, F. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Choosing the best when the optimal does not exist. *American Journal of Hematology*. volume 93, pg 553-563, 2017.
- BULLINGER, L.; DÖHNER K.; e DÖHNER, H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *Journal Of Clinical Oncology*, nº 9, volume 35, pg 934- 946, 2017.
- HELMAN, R.; SANTOS, F.P.S.; SIMÕES, B.; ATTA, E, H.;CALLERA, F.; DOBBIN, J.A.; MATTOS, E.R.; ATALLA, A. MAIOLINO, A.; ZANICHELLI, M. A.; DIEFENBACH, C.F.; DELAMAIN, M.T.; HAMERSCHLAK, N. Leucemia mieloide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. *Einstein*, nº 2, volume 9, pg 179-183, 2011.
- KOUCHKOVSKY, I; ABDUL-HAY,M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update” *Blood Cancer Journal*, volume 6, pg 1-10, 2016.
- LAGUNAS-RANGEL, F.A.; CHÁVEZ-VALÊNCIA, V.; GÓMEZ-GUIJOSA, M.A.; CORTES-PENAGOS, C. Acute Myeloid Leukemia - Genetic Changes and Their Clinical Prognosis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, nº 4, volume 11, pg 328-339, 2017.
- LICÍNIO, M.A. e DA SILVA, M.C.S. Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, nº6, volume 32, pg 476-481, 2010.
- LIN, P.; FALINI, B. “Acute Myeloid Leukemia With Recurrent Genetic Abnormalities Other Than Translocations”. *American Society for Clinical Pathology*, nº1, volume 144, pg 19-28, 2015.
- RIEGEL, M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*, nº 1, volume 37, pg 194-209, 2014.
- SAULTZ, J.N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*, nº3, volume 5, pg. 1-17, 2016.
- VELLOSO, E. D.R.P., MOTTA, A.H.A.S.; FURTADO, J.B.; BACAL, N.S.; SILVEIRA, P.A.A.; MOYSES, C.B.; SITNIK, R.; PINHO, J.R.R. Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda: revisão e descrição de casos. *Einstein*. volume 9, pg 184-189. 2011.
- YOHE, S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Medicine*, nº 3, volume 4, pg 460-478,2015.
- WEINBERG, O.K.; SOHANI, A.R.; BHARGAYA, P.; NARDI, V. Diagnostic work-up of acute myeloid leucemia. *American Journal of Hematology*, nº3, volume 92, pg. 317-321, 2017.