ÁREA TEMÁTICA: SAÚDE

Exames Citogenéticos e Análise Molecular do gene FLT3 para o diagnóstico de Leucemias e Síndromes Mielodisplásicas

Apresentador[1] Nalini Drieli Josviak
Apresentador[2] Dayane Molin
Autor[i] Nalini Drieli Josviak
Autor[3] Dayane Molin
Autor[4] Everson Augusto Krum

RESUMO: As leucemias constituem um grupo de doenças hematológicas caracterizadas por alterações, macro ou microscópicas, da constituição cromossômica do paciente resultando em modificações na estrutura ou nas funções dos genes, ocasionando um desequilíbrio entre a divisão, diferenciação e morte dos precursores hematopoéticos. As síndromes mielodisplásicas (SMD) formam um grupo de distúrbios sanguíneos clonais caracterizados por diminuição de todas as linhagens celulares no sangue periférico. Em condições fisiológicas normais, o crescimento e a proliferação celular são fenômenos dependentes da ligação de fatores de crescimento a receptores celulares específicos, sendo o principal regulado pelo gene *FLT3*. Com a comprovação da alteração da função do receptor FLT3 em LMAs, justifica-se a realização de exames para tentar esclarecer a participação e influência deste receptor no mecanismo desencadeador da leucemia, desta forma auxiliando na tomada de decisões clínicas e escolha do tratamento mais apropriado conforme a alteração citogenética encontrada. Este trabalho tem como objetivos oferecer á comunidade médica, informações sobre a constituição cromossômica, desta forma proporcionando à população gratuitamente, um exame de alto custo não realizado pelos laboratórios sediados na cidade de Ponta Grossa. Outro objetivo é utilizar os dados para análise e correlação com demais fatores envolvidos em leucemias. Até o momento foram realizadas análises citogenéticas por bandamento G em seis amostras de sangue de pacientes diagnosticados com Leucemias e Síndrome Mielodisplásica em tratamento no ISPON (Instituto Sul Paranaense de Oncologia) em Ponta Grossa - PR entre 2007 a 2009. As metáfases observadas, não apresentaram alterações numéricas de cromossomos e as alterações cromossômicas puderam ser detectadas a partir da montagem dos cariótipos. Para análise molecular, as técnicas estão sendo testadas e padronizadas para, posteriormente, serem submetidas a PCR e Eletroforese.

PALAVRAS CHAVE – LMA, LMC, SMD

Introdução

As leucemias mielóides agudas (LMAs) constituem um grupo de doenças hematológicas de grande importância na clínica médica, de curso, muitas vezes, rapidamente fatal dependendo principalmente da idade do paciente e da constituição cromossômica. A LMA se caracteriza por desequilíbrio entre a divisão, diferenciação e morte dos precursores hematopoéticos como conseqüência de modificações na estrutura ou nas funções dos genes. O real mecanismo envolvido no desenvolvimento de células leucêmicas ainda permanece desconhecido, assim como quais os fenômenos responsáveis pela transformação de células normais em leucêmicas, mas é evidente a relação com doenças genéticas, alterações cromossômicas e agentes químicos e físicos, como causadores de lesões à molécula do DNA (Gilliland, 2001).

No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), as leucemias representam cerca de 4,9% dos casos de neoplasias, com estimativa de incidência de 5.330 novos casos para

[1] Graduanda, drinaly@yahoo.com.br
[2] Graduanda, dayanem_2@hotmail.com
[3] Graduanda, dayanem_2@hotmail.com.
[4] Doutor, Professor, everson.krum@uol.com.br

homens e 4220 novos casos em mulheres para o ano de 2006 (INCA, 2006).

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo de distúrbios sangüíneos clonais caracterizados por diminuição de todas as linhagens celulares no sangue periférico – Pancitopenia, medula óssea tipicamente normocelular ou hipercelular e suas células apresentam anormalidades morfológicas francas denominadas alterações displásicas, ou seja, alterações de tamanho, na forma e na organização podendo haver um acúmulo de células da medula muito imaturas, chamadas blastos leucêmicos. A gravidade do distúrbio das células da medula varia e pode ser classificada de leve a muito grave. Sendo assim, a doença pode ser indolente ou crônica, e se manifestar como uma anemia leve; ela pode ter grande diminuição de hemácias, leucócitos e plaquetas e ser mais problemática; ou pode ter grande diminuição de células sangüíneas e ter blastos leucêmicos na medula, e ser ainda mais ameaçadora à saúde do paciente. Além disso, a doença pode progredir de tal forma que os blastos leucêmicos tomam conta da medula e a doença se transforma em leucemia mielóide aguda (Greenberg *et al*, 1997).

Em condições fisiológicas normais, o crescimento e a proliferação celular são fenômenos dependentes da ligação de fatores de crescimento, citocinas e ligantes a receptores celulares específicos, sendo que um dos principais receptores das células hematopoéticas progenitoras participante da divisão celular, é o receptor regulado pelo gene *FLT3* (Lowenberg et al, 2003). O gene *FLT3* foi descrito em 1991, através da clonagem de células progenitoras hematopoéticas $CD34^{+}$, e demonstrado que a proteína codificada pelo gene possui 993 aminoácidos e cerca de 96 kb (Rosnet et al, 1993; Small et al, 1994). A designação FLT3 é originária da sigla de fator estimulador de colônias de macrófagos *FMS-like tyrosine kinase* 3. Com a divulgação dos resultados do seqüenciamento do genoma humano, foi confirmado que este gene está situado no cromossomo 13 (13q12) e que possui 24 éxons (Abu-Duhier et al, 2001).

Com a comprovação da alteração da função do receptor FLT3 em LMAs justifica-se a realização de exames para tentar esclarecer a participação e influência deste receptor no mecanismo desencadeador da leucemia, desta forma auxiliando na tomada de decisões clínicas e escolha do tratamento mais apropriado conforme a alteração citogenética encontrada.

Objetivos

Este trabalho faz parte do registrado como “Análise Cromossômica em Neoplasias” e tem como objetivos oferecer á comunidade médica, informações sobre a constituição cromossômica, desta forma proporcionando à população gratuitamente, um exame de alto custo não realizado pelos laboratórios sediados na cidade de Ponta Grossa. Outro objetivo é utilizar os dados para análise e correlação com demais fatores envolvidos em leucemias.

Metodologia

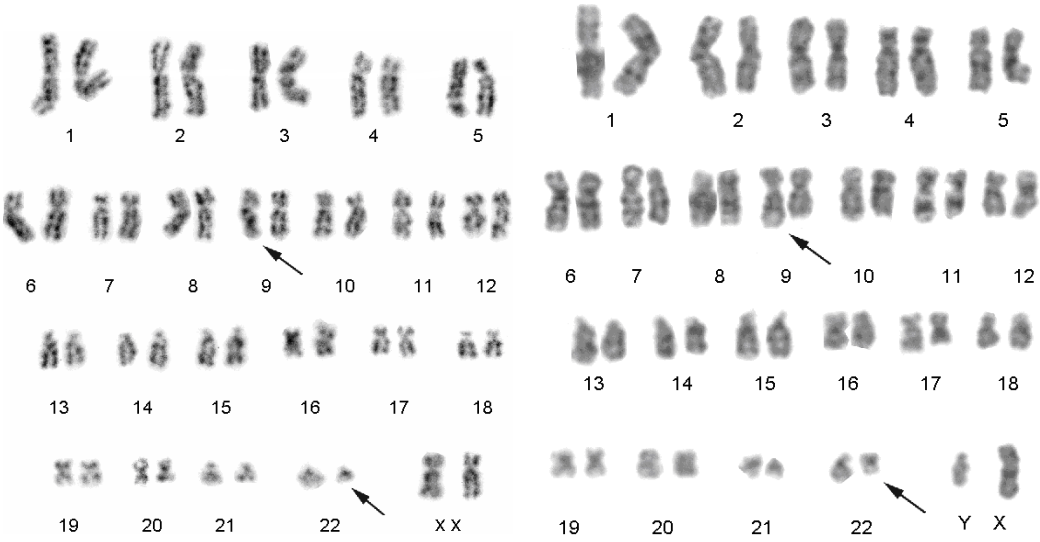
Até o momento foram realizadas análises citogenéticas em seis amostras de sangue de pacientes diagnosticados com Leucemias e Síndrome Mielodisplásica em tratamento no ISPON (Instituto Sul Paranaense de Oncologia) em Ponta Grossa- PR entre 2007 a 2009. Amostras de sangue da medula óssea dos pacientes foram destinadas à cultura de curta duração conforme a técnica adotada no laboratório de citogenética da UEPG (CHAUFFAILLE et al, 2001). As lâminas foram coradas pela banda G, tripsina-Giemsa (GTG) e as metáfases analisadas em microscópio, as descrições de cariótipo forão feitas conforme a ISCN 1995 (Mitelman, 1995). Para a extração do DNA, segundo o método Fenol-Clorofórmio, foi recolhida uma alíquota da amostra da medula óssea dos pacientes e estocada em congelador a -20º. A realização da Reação em Cadeia da Polemerase (PCR) será necessária para a detecção da duplicação do gene FLT3 com a utilização dos seguintes iniciadores (*primers*) (5' 3’) CTG GTG CAG GGG CCA CGC do *primer* (5' 3’) TCC CCC TTG CCG TCC CAA. O material será colocado em presença de azul de bromofenol e realizado uma corrida eletroforética para visualização do DNA.

Não será realizada pesquisa da DIT/FLT3 + em grupo controle, tendo em vista a ausência da anormalidade em situações fisiológicas normais.

Para essas análises moleculares, as técnicas estão sendo testadas e padronizadas para, posteriormente, serem aplicadas em amostras dos pacientes diagnosticados, pela citogenética clássica, com Leucemia Mielóide Aguda e Leucemia Mielóide Crônica.

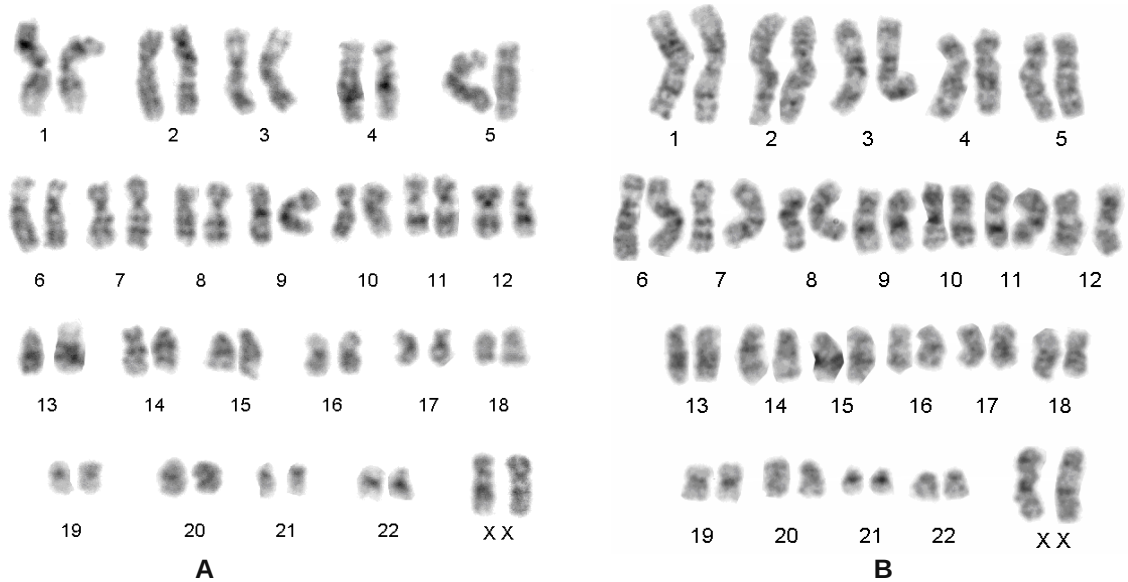
Resultados

Foram analisadas seis amostras de pacientes, três homens e três mulheres (32-88 anos) portadores de leucemias mielóides. Nenhuma metáfase observada apresentou alterações numéricas de cromossomos e as alterações cromossômicas puderam ser detectadas a partir da montagem dos cariótipos. Os dois pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) apresentaram o cromossomo Philadelphia, t(9,22) (Fig.1) e dois pacientes portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) apresentaram cariótipo normal (Fig. 2). Em dois casos não se obtiveram metáfases analisáveis. O DNA dos pacientes com diagnóstico de LMA foi extraído e após padronização das técnicas será submetido a análise do gene FLT3 por PCR e eletroforese.



A **B**

Figura 1: Cariótipo somático, obtido a partir de punção medular de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, submetido ao bandamento G (GTG). As setas indicam a translocação t(9,22). Na figura a, cariótipo de paciente do sexo feminino. Na figura b, paciente do sexo masculino.



A **B**

Figura 2: Cariótipos somáticos, obtido a partir de punção medular de pacientes do sexo feminino portadoras de leucemia mielóide aguda, submetida ao bandamento G (GTG). Em **a** e **b** cariótipos normais.

Conclusões

As técnicas de cultura e preparação citológica empregadas foram satisfatórias na obtenção de cromosssomos metafásicos, pois foi obtido um bom índice de células mitóticas. Um bom percentual de aproveitamento das amostras (66,7%) foi detectado, em consonância com o obtido em outros laboratórios mais especializados. As bandas cromossômicas ficaram evidentes, permitindo o pareamento, montagem de cariótipos e detecção das alterações cromossômicas. Desse modo, o laboratório de citogenética da Universidade Estadual de Ponta Grossa poderá oferecer á comunidade médica, informações sobre a constituição cromossômica, e realizar gratuitamente, em breve, exames para pacientes atendidos na região dos Campos Gerais.

Referencias

Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology 2001; 113:983-988.

Chauffaille ML, Figueiredo MS, Beltrani R, Antunes SV, Yamamoto M, Kerbauy J. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. Braz J Med Biol Res 2001 Jun;34(6):735-43.

Gilliland DG. Hematologic malignancies Current Opinions in Haematology 2001;8:189-191

Greenberg P.; Cox C.; Le Beau M. M.; Fenaux P.; Morel P.; Sanz G. et al.. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndrome. Blood 89 6 (1997), pp. 2079–2088.

INCA - Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa para 2006, disponível em http://www.inca.gov.br/estimativa/2006.

Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute Myeloid Leukemia and Acute Promyelocytic Leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2003;82-101.

Mitelman F (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Karger, Basel, Switzerland.

Romeu, M.; Chauffaille, M.L.; Silva, M.R.R.; Bahia, D.M.M.; Kerbauy, J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. Leukemia Research, São Paulo, v.26, n.11, p.993-996, nov. 2002.

Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Mrchetto S, Tonnelle C, Toiron Y et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. Blood 1993;82:1110-1119.

Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34 + human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. Proceedings of the National Academy of the United States of America 1994;91:459-463.