

MUTAÇÕES EM PML-RARA E RESISTÊNCIA AO ATRA NA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA PEDIÁTRICA

Palavras-Chave: Leucemia Promielocítica Aguda; PML-RARA; Mutações.

Beatriz Mendes Galvão (Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular)

Prof. Dr. José Andrés Yunes (Centro Infantil Boldrini, Laboratório de Biologia Molecular)

INTRODUÇÃO:

As leucemias são neoplasias caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea e sangue periférico. Essa proliferação é resultado da expansão clonal de uma única célula progenitora hematopoiética que acumula uma série de modificações genéticas que lhe conferem vantagem proliferativa em relação às demais células, impedindo ao mesmo tempo a diferenciação celular (ELIHU, H, 2001). A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação descontrolada, diferenciação reduzida e apoptose diminuída de células-progenitoras da linhagem mieloide e é uma doença com grande variabilidade de base genética e molecular (HEINZ, et al., 2011 & LAGUNAS-RANGEL, et al., 2017). A LMA é dividida morfológicamente em 8 subgrupos, de M0 a M7, de acordo com a classificação morfológica Franco-Americana-Britânica (FAB). A leucemia promielocítica aguda (LPA) se enquadra no subgrupo LMA-M3 ou M3 variante (hipogranular) da classificação FAB e é considerada uma leucemia rara com frequência de 4-8% do total das leucemias mieloides pediátricas, podendo haver

maior incidência em crianças de origem Hispânica e Mediterrânea (BENNETT et al., 1976, GREGORY; FEUSNER, 2003). A LPA é caracterizada pela expansão clonal de promielócitos na medula óssea e pela presença da translocação recíproca t(15;17) (q24; q21), que resulta na fusão dos genes *PML* (*Promyelocytic Leukemia Protein*) e *RARA* (*Retinoic Acid Receptor Alpha*) (Figura 1). Essa translocação está presente em 95% dos casos dessa leucemia (ZELENT et al., 2001),

PML-RAR α
(long form)
t(15;17) (q24;21)

PML-RAR α
(short form)
t(15;17) (q24;21)

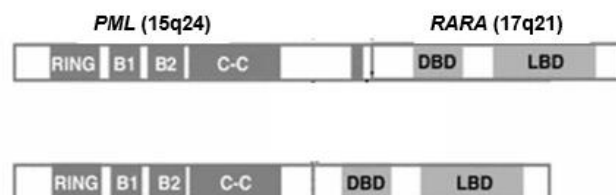


Figura 1. Representação esquemática da t(15;17) q(24;21) (adaptada de A, Tomita et al., 2013 (8))

O gene *PML* está localizado em 15q24.1 e codifica um fator de transcrição zinc-finger que desempenha várias funções, entre as quais a formação dos corpos nucleares de PML (PML nuclear bodies), os quais participam na indução de senescência celular via interação com p53, E2F e Rb (VERNIER et al., 2011; de THÉ et al., 2012).

O gene *RARA* está localizado no cromossomo 17q21.2 e codifica um dos receptores nucleares do ácido retinóico (*RARA*). *RARA* forma heterodímeros com o Receptor X Retinóide Gama (*RXRG*) e se liga a sequências específicas no DNA, denominados Elementos de Resposta ao Ácido Retinóico (*RARE*, do inglês *Retinoic Acid Response Elements*). Na ausência do ligante, o *RARA-RXRG* forma um complexo multiproteico com os repressores *NCOR1* e *SMRT* (*NCOR2*) e proteínas histona desacetilases, que levam à desacetilação de histonas, condensação da cromatina e repressão da transcrição. Na presença do ligante, o complexo de *RARA-RXRG* assume uma outra conformação 3D, dissociando-se de *NCOR1* e *SMRT* e recrutando fatores da transcrição e proteínas histona acetiltransferases que levam à abertura da cromatina e ativação da transcrição (GRIGNANI et al., 1993). A proteína *RARA* possui seis domínios funcionais, que são divididos de A à F. O domínio C é responsável pela ligação às sequências *RARE* no DNA e o domínio E, conhecido como domínio de ligação ao ligante (*LBD*) possui regiões responsáveis pela interação com o ligante e heterodimerização com o *RXRG* (PANDOLFI et al., 199).

Tanto os domínios de *PML* quanto os de *RARA* são importantes para a leucemogênese, como também para a sensibilidade ao tratamento com ácido trans-retinóico e trióxido de arsênio (HUANG et al., 1993). Estudos revelaram que as diferentes isoformas de *PML-RARA* podem estar correlacionadas com a resposta dos pacientes ao tratamento, provavelmente devido aos diferentes domínios de *PML* retidos no transcrito de fusão, porém, os resultados encontrados ainda são controversos. A

proteína quimérica resultante da fusão *PML-RARA* inibe de forma dominante a via dos retinóides, bloqueando a maturação celular da linhagem mieloide, inibindo também a função homeostática/supressora de *PML* e seus corpos nucleares (AVVISATI et al., 2001,).

Os avanços obtidos no tratamento da LPA mudaram o curso clínico da doença, de uma leucemia fatal, para uma leucemia com altas chances de cura (HUANG et al., 1998).

O tratamento atualmente é realizado à base de antraciclina e ácido all-trans retinóico (*ATRA*), combinação que melhorou significativamente o resultado clínico dos pacientes quando comparado com a quimioterapia convencional (LO-COCO et al., 2010). A incorporação do *ATRA* ao tratamento da LPA é considerada o primeiro caso de tratamento alvo-dirigido contra o câncer. Embora não se saiba ao certo como, o *ATRA* restaura a ativação da via dos retinóides, aparentemente promovendo a degradação da proteína de fusão *PML-RARA* e modificando as histonas nos promotores dos genes alvo de *RARA*, de tal modo que a repressão transcricional da *PML-RARA* é anulada, restaurando-se a ativação transcricional mediada pelos retinóides, consequentemente promovendo forte indução da diferenciação dos promielócitos em células maduras (GIANNI et al., 2000).

Alguns pacientes apresentam resistência ao *ATRA* e/ou *ATO* e essa resistência foi relacionada a mutações em *PML-RARA*. Essas mutações são encontradas de 30-60% na primeira ou segunda recaídas dos pacientes com LPA (HATTORI et al., 2018). A

resistência ao ATRA está associada a mutações no domínio LBD de *RARA*. Já as mutações missense no domínio B2 box do *PML* conferem resistência ao ATO e foram encontrados em pacientes refratários ou recidivados, esse domínio de *PML* é importante para a ligação direta ao ATO (DING et al., 1998, IMAIZUMI et al., 1998, ZHOU et al., 2002, GALLAGHER et al., 2006, GALLAGHER et al., 2012).

Local da mutação	Descrição da mutação	Amostras analisadas	Amostras com mutação	Ref
LBD de <i>RARA</i>	Deleção de 7 aminoácidos (p.K227_T233del), mutação pontual, (p.R217S).	1	1	1
LBD de <i>RARA</i>	Substituição G815A e A889T.	23	2	2
LBD de <i>RARA</i>	Substituição Leu290Val, Arg394Trp, Met413Thr e T38C.	12	3	3
LBD de <i>RARA</i>	Mutações missenses em Arg394 e deleção de 12 aminoácidos de Arg394 à a Leu398, substituição de Met394.	18	6	4
LBD de <i>RARA</i>	Mutações missenses (L224P e R276Q), deleções e sem sentido.	45	18	5
LBD de <i>RARA</i>	Substituição Pro407Ser, Arg294Trp, Gly289Arg, Lys207Asn e Arg272Gln.	8	5	6

Tabela 1. Descrição das mutações segundo a literatura em pacientes com recaída de LPA.

A implementação de testes para mutações em *PML-RARA*, e o conhecimento da frequência e características dessas mutações e sua associação à resposta clínica

dos pacientes pode se tornar uma informação útil para a escolha do tratamento a ser seguido em casos de recidiva ou resistência ao tratamento. Embora a sobrevida global da LPA tenha obtido melhora significativa desde a introdução do ATRA e do ATO, a recaída da doença devido à resistência à essas drogas continua sendo um problema clínico (HATTORI et al., 2018).

OBJETIVOS:

O presente projeto possui o objetivo de analisar mutações no gene de fusão *PML-RARA*, especificamente os domínios LBD e Bbox e sua possível relação com a recaída e/ou resistência ao tratamento com ATRA e ATO em pacientes pediátricos com leucemia promielocítica aguda.

METODOLOGIA:

Pretende-se analisar 12 pacientes que apresentaram recaída molecular da doença e 3 pacientes que foram maus respondedores, além de 15 pacientes considerados grupo “controle” que apresentaram a resposta esperada ao tratamento.

Utilizamos para os ensaios, amostras coletadas através da punção da medula óssea dos pacientes no dia em que apresentaram recaída molecular. Através dessa, extraiu-se o RNA utilizando kit comercial e fez-se necessário a síntese de cDNA para a estabilização da fita de RNA.

Foi padronizada a reação de cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas (Nested-PCR) para a amplificação do gene de fusão *PML-RARA*, utilizando iniciadores que cobrem do éxon 1 do *PML* ao éxon 7 de *RARA*, os

amplicons da segunda etapa da PCR foram sequenciados bidirecionalmente através do sequenciamento Sanger, utilizando iniciadores no domínio Bbox do gene *PML* e no domínio LBD de *RARA* e os cromatogramas gerados foram analisados por inspeção visual no *Software Chormas* e a sequência em FASTA foi submetida para análise no *Software MutationExplorer*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir da metodologia apresentada, até o presente momento, 7 pacientes foram sequenciados, dos quais um paciente com recaída molecular, apresentou uma mutação no domínio LBD do gene *RARA*, sendo ela uma deleção de aproximadamente 600 pares de base (pb) deste domínio. A mutação, parece estar presente em uma subpopulação de células ou ser oriunda de uma deleção posterior à duplicação da região cromossômica *PML-RARA*, porque a paciente apresenta na eletroforese em gel de agarose 1% duas bandas, as quais representam o tamanho esperado de aproximadamente 1239pb e outra banda de aproximadamente 630pb.

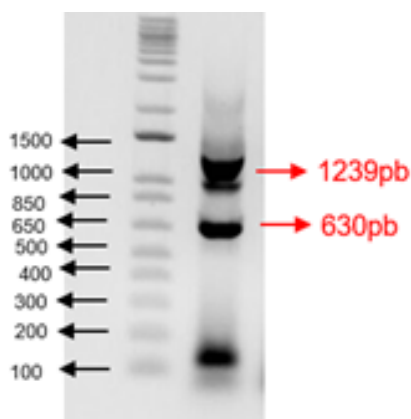


Figura 3. Imagem da Eletroforese em gel de agarose do paciente que apresentou mutação no domínio LBD. **Legenda)** pb) pares de base demarcados com a seta azul a partir do padrão de molecular de massa, setas vermelhas indicando a altura das bandas obtidas.

A presença da mutação foi confirmada através da análise do sequenciamento Sanger pelo *Software MutationExplorer*, o qual apresentou duas sequências sobrepostas, uma contendo todo o domínio LBD e a outra contendo apenas aproximadamente 200pb do mesmo.

CONCLUSÕES:

Desta forma, pode-se concluir até o presente momento, que aproximadamente 14% dos pacientes que apresentaram recaída molecular da LPA possuem mutações no domínio LBD. Até o final do estudo, todos os pacientes serão sequenciados e analisados para ambos os domínios.

De acordo com o que foi encontrado na literatura e descrito na tabela 1, a frequência de mutações está consideravelmente em um nível mais baixo, porém, ainda restam 8 pacientes para serem analisados, o que mudaria a porcentagem de mutações, caso sejam encontradas.

BIBLIOGRAFIA

- AVVISATI, G.; LO COCO, F.; MANDELLI, F. Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical and Morphologic Features and Prognostic Factors. *Semin. Hematol.*, v. 38, n. 1, p. 4-12, 2001.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB). *Br. J. Haematol.*, v. 33, n. 4, p. 451-8, 1976.
- DE THÉ, H.; LE BRAS, M.; LALLEMAND-BREITENBACH, V. The Cell Biology of Disease: Acute Promyelocytic Leukemia, Arsenic, and PML Bodies. *J. Cell. Biol.*, v. 198, n.1, p. 11-21, 2012.
- DING, W. et al. Leukemic Cellular Retinoic Acid Resistance and Missense Mutations in

the PML-RARalpha Fusion Gene After Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia From Treatment With All-Trans Retinoic Acid and Intensive Chemotherapy. *Blood.*, v. 92, n. 4, p.1172-83, 1998. **((Ref3) Tabela).**

-ELIHU, H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer.*, v. 92, n. 5, p. 1059-73, 2001.

-GALLAGHER, R. E. et al. Relapse of acute promyelocytic leukemia with PML-RARalpha mutant subclones independent of proximate all-trans retinoic acid selection pressure. *Leukemia.*, v. 20, n. 4, p. 556-62, 2006. **((Ref4) Tabela).**

-GALLAGHER, R. E. et al. Treatment influenced associations of PML-RARalpha mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute Ann Hematol promyelocytic leukemia. *Blood.*, v. 120, n. 10, p. 2098-108, 2012. **((Ref5) Tabela).**

-GIANNI, M. et al. Retinoid-dependent Growth Inhibition, Differentiation and Apoptosis in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. Expression and Activation of Caspases. *Cell. Death.Differ.*, v. 7, n. 5, p. 447-60, 2000.

- GREGORY, J. Jr.; FEUSNER, J. Acute Promyelocytic Leukaemia in Children. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, v. 16, n. 3, p. 483-94, 2003.

- GRIGNANI, F. et al. The Acute Promyelocytic Leukemia-Specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell.*, v. 74, n. 3, p. 423-31, 1993.

-HATTORI, H. et al. Identification of the novel deletion-type PML-RARA mutation associated with the retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Plos One.*, v. 13,n. 10, p. e0204850, 2018. **((Ref1) Tabela).**

-HEINZ, Sill *et al.* Therapy-related Myeloid Neoplasms: Pathobiology and Clinical Characteristics. fev. 2011. DOI 10.1111/j.1476-5381.2010.01100.x.

- HUANG, W. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: Clinical Relevance of Two Major PML-RAR Alpha Isoforms and Detection of Minimal Residual Disease by

retrotranscriptase/polymerase Chain Reaction to Predict Relapse. *Blood.*, v. 82, n. 4, p. 1264-9, 1993.

-HUANG, M. E. et al. Use of All-Trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood.*, v. 72, n. 2, p. 567-72, 1988

-IMAIZUMI, M. et al. Mutations in the E-domain of RAR Portion of the PML/RAR Chimeric Gene May Confer Clinical Resistance to All-Trans Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood.*, v. 92, n. 2, p. 374-82, 1998. **((Ref2) Tabela).**

-LAGUNAS-RANGEL, F. A. et al. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem. Cell. Res.*, v. 11, n. 4, 328-339, 2017.

- LO-COCO, F. et al. Front-line Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With AIDA Induction Followed by Risk-Adapted Consolidation for Adults Younger Than 61 Years:Results of the AIDA-2000 Trial of the GIMEMA Group. *Blood.*, v. 116, n. 17, p. 3171-9, 2010.

- PANDOLFI, P. P. et al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *Embo J.*, v. 11, n. 4, p. 1397-407, 1992

- VERNIER, M. et al. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes. Dev.*, v. 25, n. 1, p. 41-50, 2011.

- ZELENT, A. et al. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.*, v. 20, n. 49, p. 7186-203, 2001.

-ZHOU, D. C. et al. Frequent mutations in the ligand-binding domain of PML-RARalpha after multiple relapses of acute promyelocytic leukemia: analysis for functional relationship to response to all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo.*Blood.*, v. 99, n. 4, p. 1356-63, 2002.

((Ref6) Tabela)