

**DIFERENTES PERFIS
CELULARES
INDIVIDUALIZAM O
TRATAMENTO E A CHANCE
DE CURA NA LEUCEMIA
LINFOIDE AGUDA-LLA**

**DIFFERENT CELL PROFILES INDIVIDUALIZE THE
TREATMENT AND CHANGE OF CURE IN ACUTE
LYMPHOID LEUKEMIA - ALL**

Neila Zanela Puerta
Unicesumar – Centro Universitário de Maringá
neilazanella@hotmail.com

Sônia Trannin de Mello
UEM - Universidade Estadual De Maringá
stmello@uem.br

Débora de Mello Gonçalves Sant'ana
UEM - Universidade Estadual De Maringá
dmgsana@uem.br

Resumo

A leucemia linfóide aguda (LLA) se caracteriza pela presença de blastos leucêmicos os quais são células que se originam de precursores linfóides B e T na medula óssea, e proliferam de maneira desordenada por tecidos e órgãos. Estas células apresentam alterações genéticas que conferem vantagens para sua sobrevivência e proliferação. Estudar estas mutações é a base para entender a patogênese da doença, e classificá-la de maneira correta. Neste sentido, faz-se necessário conhecer as características metabólicas, morfológicas e genéticas apresentadas pelos blastos ao desencadear a doença, para diferenciá-los dos precursores linfóides normais, direcionando a terapia de acordo com as especificidades de cada paciente. O intuito deste estudo foi elucidar o comportamento das células leucêmicas, destacando a importância de caracterizar os diferentes perfis celulares em pacientes com LLA para o direcionamento de terapias específicas, facilitando o diagnóstico e tratamento. Para obtenção das informações, foi realizado um estudo em publicações científicas entre 2008 a 2018 disponíveis nas bases de dados Google Acadêmico, Portal Capes, *Pub Med*, *Scielo* e *Web of Science*. O estudo demonstrou que ocorrem inúmeras alterações genéticas nas células leucêmicas decorrentes de alterações cromossômicas como mutações, deleções, translocações, rearranjos e translocações numéricas. Técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo, e a *FISH* (fluorescence *in situ* hybridization) permitem definir parâmetros como a distinção da expressão de antígenos que as diferem das células normais, enquanto a aplicação de anticorpos monoclonais, e a reprogramação com células T CAR são novas possibilidades no tratamento adequado e individualizado do paciente, aumentando a chance de cura da LLA.

Palavras-chave: Células leucêmicas, Reprogramação metabólica, Precursores linfóides.

Abstract

Acute lymphoid leukemia (ALL) is characterized by the presence of leukemic blasts which are cells that originate from B and T lymphoid precursors in the bone marrow, and proliferate in a disordered way by tissues and organs. These cells have genetic alterations that confer advantages for their survival and proliferation. Studying these mutations is the basis for understanding the pathogenesis of the disease, and classifying it correctly. In this sense, it is necessary to know the metabolic, morphological and genetic characteristics presented by the blasts at the onset of the disease, to differentiate them from the normal lymphoid precursors, directing the therapy according to the specificities of each patient. The purpose of this study was to elucidate the behavior of leukemic cells, highlighting the importance of characterizing the different cellular profiles in patients with ALL in order to target specific therapies, facilitating diagnosis and treatment. To obtain the information, a study was conducted in scientific publications between 2008 and 2018 available in the Google Academic, Capes Portal, *Pub Med*, *Scielo* and *Web of Science* databases. The study demonstrated that numerous genetic alterations occur in the leukemic cells due to chromosomal alterations such as mutations, deletions, translocations, rearrangements and numerical translocations. Immunophenotyping techniques by flow cytometry and *FISH* (fluorescence *in situ* hybridization) allow to define parameters such as the distinction of the expression of antigens that differentiate them from normal cells, while the application of monoclonal antibodies and reprogramming with CAR T cells are new possibilities in the adequate and individualized treatment of the patient, increasing the chance of cure of ALL.

Key-words: Leukemic cells, Metabolic reprogramming, Lymphoid precursors.

INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica que determina proliferação, acúmulo e infiltração de células imaturas da medula óssea (ZANICHELLI et al. 2010). Resulta na produção descontrolada de blastos com características linfóides e no bloqueio da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas (HAMERSCHLAK, 2008). Os blastos são células leucêmicas imaturas, com desenvolvimento alterado, derivadas de precursores linfóides B e T da medula óssea (WOHLFAHRT et al., 2015). A LLA pode se espalhar para os linfonodos, baço, fígado, SNC e outros órgãos, possui características específicas para adultos e para crianças, sendo predominante em crianças (INCA, 2017). No Brasil, estima-se que de 10 a 15 novos casos de câncer infantil abaixo de 15 anos, 4 são LLA, com pico de incidência entre os 2 e 5 anos de idade. É mais comum em pacientes do sexo masculino e raça branca, com percentual de cura em torno de 80%. Nos adultos, a incidência aumenta após os 60 anos, com prognóstico clínico desfavorável (DANTAS et al., 2015).

Com base em alguns sintomas evidenciados no paciente, como anemia, fadiga, sangramentos excessivos em cortes e gengiva, hemorragias e lesões na pele, são realizados inicialmente exames laboratoriais, em que na maioria das vezes evidenciam-se anemias, trombocitopenias, granulocitopenia e presença de blastos. A leucometria periférica pode ser variável, sendo em 25% dos pacientes elevada ($>50.000/\mu\text{L}$), 50% entre $5.000/\mu\text{L}$ e $50.000/\mu\text{L}$ e 25% baixa ($<5.000/\mu\text{L}$). Geralmente após análise dos exames laboratoriais é solicitada punção da medula óssea (VIEIRA; NEVES; TONELLI, 2018). O diagnóstico da LLA é estabelecido pela presença de 25% ou mais de blastos na medula óssea e pode ter origem em precursores linfóides B que correspondem a 85% dos casos ou precursores linfóides T que correspondem a 15%. Estas células estão presentes na medula óssea, linfonodos e timo (RODRIGUES; MARTIN; MORAES, 2016).

Na medula óssea, a medida que as células-tronco amadurecem para progenitores, precursores e células efectoras maduras, passam por uma série de mudanças que definirão suas funções, como a capacidade fagocitária ou hemoglobinizacão. Este processo inclui a perda progressiva de plasticidade, ou seja, a capacidade de se tornarem outros tipos de células. À medida que as células se diferenciam também podem perder a capacidade proliferativa, entretanto as células linfóides mantêm esta capacidade, mas ligam sua proliferação ao

reconhecimento de determinadas proteínas ou peptídeos por receptores específicos de antígeno em sua superfície (LONGO, 2010).

Os blastos leucêmicos apresentam alterações genéticas que conferem uma vantagem para a sua sobrevivência e proliferação. Estudar estas mutações é a base para entender a patogênese da doença, sendo importante classificá-las de maneira correta, definindo o prognóstico, no intuito de adaptar o tratamento da maneira mais precisa, e obter resultados satisfatórios (GARCÍA; CABRERO; CAÑIZO, 2016). Em muitos casos, a primeira mutação genética ocorre ainda *in utero*, podendo ser uma translocação ou mutação de ponto, com um evento genético secundário ocorrendo mais tarde na infância, possivelmente desencadeado por reação a uma infecção, podendo ocorrer alterações do número de cópias no genoma, comprometendo a codificação de funções na leucemogênese que é o processo de indução, desenvolvimento e progressão da leucemia. Em outras situações, a doença pode surgir como mutação pós-natal, em uma célula precursora linfóide primitiva (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

As alterações cromossômicas estruturais como translocações, deleções, rearranjos e alterações numéricas acometem com frequência as leucemias, e muitas vezes estão ligadas a mutações em duas classes específicas de genes, os supressores tumorais e os oncogenes, alterando a normalidade do ciclo, maturação e diferenciação celular (MOELAS; BARBOSA, 2014).

Como o câncer é uma doença heterogênea, pacientes podem ter evolução clínica distinta, diante do mesmo tratamento, podendo apresentar variação na resposta tumoral a este tratamento e na intensidade dos efeitos adversos. Isso ocorre devido as variações genéticas que são pequenas diferenças ou polimorfismos nos genes conhecidas como SNP (*single nucleotide polymorphism*), e pela expressão gênica em cada tecido. Personalizar a medicina surge como uma alternativa, trazendo a possibilidade de escolha de tratamentos mais efetivos e com menos efeitos adversos (COLÓ, 2011).

Com base nas informações expostas, o objetivo deste estudo foi elucidar o comportamento das células leucêmicas, destacando a importância em caracterizar os diferentes perfis celulares de cada paciente com LLA para o direcionamento de terapias específicas, facilitando o diagnóstico e tratamento.

DESENVOLVIMENTO

Foi realizado um estudo em publicações científicas, tendo como base de dados artigos, livros e trabalhos acadêmicos no período de 2008 a 2018. O acesso aos arquivos se deu pelas plataformas de buscas Google Acadêmico, Portal Capes, *Pub Med*, *Scielo* e *Web of Science*. Para a seleção das publicações utilizadas no levantamento de dados referentes ao tema foram inseridos os termos: blastos, leucemia linfóide aguda, plasticidade metabólica. De acordo com o tema abordado e o objetivo da pesquisa, foi realizada a leitura dos artigos, análise e seleção das informações relevantes para elaboração do texto.

Na leucemia linfóide aguda, a classificação morfológica tem como base a identificação da linhagem celular e o estágio de diferenciação da célula, sendo a L1: com frequência de 85% dos casos em crianças, apresenta blastos homogêneos, com núcleo regular e cromatina homogênea, nucléolo pequeno ou ausente, pouco citoplasma e basofilia leve a moderada. L2: com frequência de 70% dos casos em adultos, o núcleo é irregular, a cromatina heterogênea, com nucléolos grandes. L3: é um subtipo raro, ocorre de 1% a 2% dos casos, os blastos são grandes, com nucleólos proeminentes, cromatina homogênea, citoplasma abundante e vacuolização citoplasmática numerosa, cobrindo o núcleo (LADINOS-CASTRO et al., 2015).

Conforme evidenciado por Costa (2013), as células estromais presentes na medula óssea são elementos chaves na maturação das células B providenciando contatos célula-célula específicos e diversas citocinas solúveis. Estas células juntamente com os osteoblastos e osteoclastos, células T e outros leucócitos formam nichos específicos que oferecem as condições microambientais necessárias para a maturação de cada subtipo de célula B.

No intuito de investigar as diversas alterações genéticas que afetam a maturação dos precursores linfóides, Lemos (2013) aborda técnicas como a imunofenotipagem por citometria de fluxo que possibilita classificar as leucemias em pré-B, B e T pela positividade de marcadores específicos e caracterizar os blastos linfóides por marcadores de membrana como CD07, CD10, CD19, CD20 e marcadores citoplasmáticos como o TdT. Já na técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (Fish), o método contempla as mutações de maior importância na leucemia, em uma única reação, por meio de uma plataforma de sondas, possibilitando a detecção das anormalidades, e ampliando o painel de marcadores imunofenotípicos.

Wohlfahrt et al. (2015) destacam que as hematogônias são precursores linfóides B normais na medula óssea, enquanto os linfoblastos B são células neoplásicas imaturas, presentes nos pacientes com LLA, ambos possuem características morfológicas semelhantes, e até expressão dos mesmos antígenos quando realizada análise imunofenotípica, como

exemplo CD10 e CD34, entretanto, ocorre distinção na continuidade de expressão destes antígenos, que podem ser identificados também com métodos como a imunofenotipagem por citometria de fluxo, permitindo a diferenciação das células com maior precisão. Tal técnica permite a interação entre anticorpos monoclonais e antígenos de membrana, citoplasmáticos e intracelulares.

Cordeiro et al. (2014) expõem a importância dos anticorpos monoclonais como proteínas que reconhecem antígenos de maneira específica e com alta afinidade, e podem ser utilizados como terapia alvo, com alta especificidade e poucos efeitos colaterais, aumentando a ação dos fármacos, visto que possuem a capacidade de carregar um agente terapêutico e se ligar especificamente ao antígeno de uma determinada célula. Desta maneira, surgem como uma opção de terapia a ser utilizada na LLA. Novos estudos utilizando anticorpos monoclonais considerando os diversos perfis celulares na LLA possibilitariam à inúmeros pacientes usufruir deste tratamento específico e eficaz.

Terwilliger e Abdul-hay (2017) relatam que caracterizar o imunofenótipo e o genótipo da leucemia de cada paciente para aplicar a terapia direcionada leva a melhorias na remissão e sobrevivência. Demonstram opções terapêuticas com imunocombinados, como o inotuzumab ozogamicina (Besponsa®), que se liga ao antígeno CD22 na célula leucêmica, é internalizado e libera uma citotoxina que mata estas células. Enquanto que anticorpos, como o blinatumomab (Blinicyto®), causa a ativação direta de células T contra blastos, com alvo no antígeno CD19. As células T CAR (Receptor de Antígeno Quimérico) envolvem um mecanismo similar, no qual as células T do próprio paciente são geneticamente programadas para reconhecer células leucêmicas, induzindo uma resposta imune antileucêmica. Outros agentes existentes, como o bortezomibe (Velcade®), a decitabina (Dacogen®) e o ruxolitinibe (Jakavi®), com bons resultados no tratamento de várias neoplasias, estão sendo estudadas para aplicação na LLA como novas estratégias de tratamento.

As alterações citogenéticas mutacionais são relatadas por Hamerschlak (2008) como um fator importante na LLA, podendo ser favoráveis como as associadas aos precursores B, envolvendo a hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, tornando os blastos mais sensíveis à quimioterapia, e a fusão TEL-AML1 ou t(12:21) que torna os pacientes mais suscetíveis à ação da enzima L-asparaginase. Pacientes com trissomias dos cromossomos 4, 10, 17 e 18 tendem a ter um bom prognóstico. No caso da LLA de precursores T, com envolvimento de um ou mais oncogenes como o LYL1 com LMO2, HOX11, TAL1 com LMO1 ou LMO2,

HOX11L2 e MLL-ENL. O prognóstico favorável está associado aos subtipos HOX11 ou MLL-ENL.

Tovar (2015) salienta as inúmeras anormalidades citogenéticas que estão relacionadas a um mau prognóstico, como a diminuição do número de cromossomos, translocações entre os cromossomos 9 e 22, ou entre 1 e 19, e ainda a que afeta os cromossomos 4 e 11 em pacientes pediátricos. Já a translocação, a t(11; 19), é desfavorável na LLA-B e favorável na LLA-T. O efeito exercido pelas translocações pode desencadear a expressão anormal de enzimas que regulam o processo de sinalização intracelular.

Santos (2018) destaca a translocação cromossômica identificada como t(9;22) (q34;q11.2) conhecida como cromossomo Philadelphia (Ph+), envolvendo os genes BCR e ABL1 é o rearranjo cromossômico mais frequente da LLA na fase adulta, com baixa frequência na infância. Já a anormalidade cromossômica t(12;21) (p13;q22) com a fusão dos genes TEL e AML1 é mais comum em crianças, sendo rara em adultos. E conforme evidenciado por Min e Lee (2017), as células cancerosas são propensas a várias mutações oncogênicas, como as mutações RAS, EGFR, MYC e BRAF, esses genes também podem influenciar as alterações metabólicas no câncer conforme identificado em vários estudos sobre a associação de alterações oncogênicas com o metabolismo de reprogramação. Os autores Min e Lee (2017) destacam ainda as descobertas recentes que demonstram a religação metabólica adicional nas células cancerígenas e consequentes alterações nas vias de sinalização celular e no microambiente tumoral, incluindo mudanças no metabolismo de glicose, lipídios e aminoácidos.

Pavlova e Thompson (2016) também evidenciam a reprogramação metabólica em células cancerígenas decorrente de mutações oncogênicas, que causam alterações nos metabólitos intracelulares e extracelulares. Tais mudanças metabólicas se manifestam na desregulação da captação de glicose e aminoácidos, no uso de modos oportunistas para a aquisição de nutrientes, no aumento da demanda por nitrogênio, nas alterações da regulação gênica dirigida por metabólitos e interações metabólicas com o microambiente tumoral. Estas alterações permitem que as células cancerígenas mantenham a proliferação desregulada, e resistam aos desafios metabólicos associados às limitações de oxigênio e nutrientes.

Outro fator relevante relatado por Vizcaíno et al. (2011), é o polimorfismo genético das enzimas envolvidas no metabolismo dos quimioterápicos utilizados no tratamento da LLA, que influencia na eficácia terapêutica e condiciona a falta de toxicidade ou a presença desta, o que pode ser fatal. Evidenciam diversas variantes alélicas das enzimas tiopurina-metil-

transferase, metileno-tetra-hidrofolato-redutase e glutathione-transferase que são sistemas desintoxicantes de alguns dos quimioterápicos empregados no tratamento da leucemia linfóide aguda. As características genéticas dessas enzimas e a frequência de seus polimorfismos influenciam no efeito e reações da quimioterapia antineoplásica. Neste sentido, é de extrema importância determinar o perfil genético do paciente, antes de ser exposto a certos medicamentos, permitindo prever a resposta a um tratamento eficaz, aplicando o conceito da medicina personalizada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das informações obtidas, destaca-se a importância de caracterizar o perfil celular de cada paciente com LLA, no intuito de aplicar o protocolo de tratamento considerando as diversas alterações nas células leucêmicas. Técnicas como a imunofenotipagem por citometria de fluxo, hibridação *in situ* por fluorescência (Fish) ajudam na identificação do perfil celular, enquanto a aplicação de anticorpos monoclonais, a reprogramação com células T CAR (Receptor de Antígeno Quimérico) são um progresso na terapia desta doença. Compreender as alterações citogenéticas associadas ao perfil de cada paciente é de extrema importância para se proceder com o tratamento, já que o fármaco pode ter sua ação potencializada ou reduzida considerando a heterogeneidade entre as células leucêmicas e seus diversos perfis na LLA.

REFERÊNCIAS

COLÓ, A. Personalização da medicina: em que ponto da prática estamos? Revista Chymion, 8ª Ed., 2011.

CORDEIRO, M. D. S.; SILVA, N. L. F.; VAZ, M. R. F.; NÓBREGA, F. F. F. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. Revista Saúde & Ciência Online, v. 3, n. 3, p. 252-262, 2014.

COSTA, L. P. Alterações fenotípicas nas células B normais em leucemia linfocítica crônica-B. 2013. 68 f. Tese de Mestrado (Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial). Instituto Politécnico de Coimbra – IPC. 2013.

DANTAS, G. K. S.; SILVA, L. T. A.; PASSOS, X. S.; CARNEIRO, C. C. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infanto-juvenis. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 3-18, 2015.

GARCÍA, L.; CABRERO, M.; CAÑIZO, C. del. Leucemias agudas. Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, v. 12, n. 21, p. 1201-1212, 2016.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. Jornal de Pediatria (Rio J.), Porto Alegre, v. 84, n. 4, supl. p. S52-S57, 2008.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Fundamentos em hematologia. 6ª edição, p. 224, Porto Alegre: Artmed, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCÊR JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018 - incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2018.

LADINES-CASTRO, W.; BARRAGÁN-IBAÑEZ G.; LUNA-PÉREZ M. A.; SANTOYO-SÁNCHEZ A.; COLLAZO-JALOMA J.; MENDOZA-GARCÍA E.; RAMOS-PEÑAFIEL C. O.Morphology of leukaemias. Revista Médica del Hospital General de México, 2015.

LEMO, J.S. Leucemia linfóide aguda: Avanços no diagnóstico. 2013. 49 f. Monografia (Especialista em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial) – Universidade Paulista, Centro de Consultoria Educacional, Recife, 2013.

LONGO, D.L. Harrison's Hematology and Oncology. p.785, 2010.

MIN, H-Y; LEE, H-Y. Oncogene-driven metabolic alterations in cancer. Biomolecules & therapeutics, v. 26, n. 1, p. 45, 2017.

MOELAS, T. C. D.; BARBOSA, I. P. R. Alterações cromossômicas estruturais nas leucemias: mecanismos de regulação ao potencial carcinogênico. 14º Congresso Nacional de

Iniciação Científica. Conic, Semesp, 2014. Disponível em: <<http://conic-semesp.org.br/anais/files/2014/trabalho-1000017264.pdf>>. Acesso em 21 nov. 2018.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell metabolism*, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.

VIZCAÍNO, Y. P.; NÚÑEZ, A. A.; LONDIAN, M. A. V.; GARCÍA, C. M. A.; GUERRA, C.I.R. Farmacogenética aplicada al tratamiento de la leucemia linfóide aguda. *Revista Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, Cidade de Havana, v. 27, n. 3, p. 283-290, 2011. Disponível em <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300003&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 01 fev. 2019.

RODRIGUES, A. B.; MARTIN, L. G. R.; MORAES, M. W. de. *Oncologia multiprofissional: patologias, assistência e gerenciamento*. 1ª edição, p. 186-193. Manole, 2016.

SANTOS, W. M. dos. Influência de novos marcadores imunofenotípicos no prognóstico e sobrevida de leucemias linfóides agudas: revisão sistemática e meta-análise. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, v. 7, n. 6, p. e577, 2017.

TOVAR, C. F. L. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Revista Medicina e Investigación*, Toluca, v. 3, n. 1, p. 85-91, 2015. Disponível em: <<http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/49591/19%20FACTORES%20DE%20PRON%20C3%93STICO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 10 de jan. 2019.

VIEIRA, A. F.; NEVES, B.; TONELLI, S. R. Perfil epidemiológico da leucemia linfóide nas regiões do Brasil. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 14, n. 37, p. 130-143, 2018. Disponível em: <<http://revista.lusiada.br/index.php/ruep/article/view/933>>. Acesso em 21 de nov. 2018.

ZANICHELLI, M.A.; COLTURATO, V.R.; SOBRINHO, J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation in adults in acute lymphoblastic leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, suppl. 1, p. 54-60, 2010.

WOHLFAHRT, A. B.; HANNEL, L.; OLIVEIRA, L. Z.; SOARES, P. B.; SILVA, J. E. P. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p. 7-12, 2015.