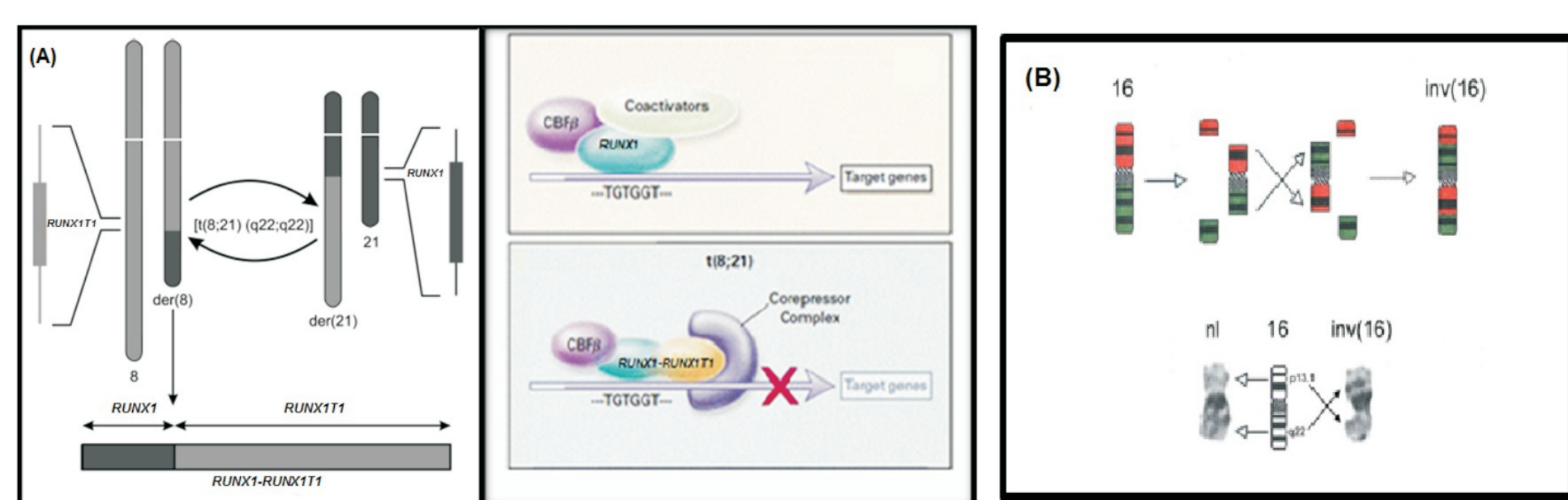


# Mutações nos genes *ASXL1* e *ASXL2* nas LMAs pediátricas com alteração no complexo de transcrição CBF (*core binding factor*)

Filipe Vicente dos Santos Bueno<sup>1</sup>, (MS), Francianne Gomes Andrade<sup>1</sup>, Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ

## INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) com alteração no complexo de transcrição CBF (*Core Binding Factor*) inclui a LMA com as translocações cromossômicas t(8;21)(q22;q22) e inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), que geram as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11*, respectivamente (Figura 1). Essas fusões são classificadas como alterações do tipo II, que levam ao bloqueio da diferenciação mieloide no clone leucêmico. Estudos prévios demonstraram que mais de 50% dos casos de LMA-CBF apresentam mutações nos genes *c-KIT*, *FLT3* e *K/N-RAS*, que são as chamadas alterações do tipo I e que conferem vantagem proliferativa aos blastos mieloídes. A presença da heterogeneidade genética dentro da LMA-CBF coopera para que esses pacientes tenham uma incidência de recaída de 40%. Recentemente, novas alterações em genes envolvidos na regulação epigenética, tais como nos genes *Additional sex combs* (*Asx*)-like 1 (*ASXL1*) e *ASXL2* tem sido identificadas na LMA-CBF, sendo classificadas como alterações do tipo III. Mutações em *ASXL1/2* foram descritas em 25% em pacientes pediátricos com LMA-CBF, distinguindo essa entidade das LMAs de adultos. Até o momento, as consequências clínicas das mutações em *ASXL1/2* nas LMAs pediátricas são pouco descritas e o envolvimento desses genes na leucemogênese precisa ser melhor esclarecido.



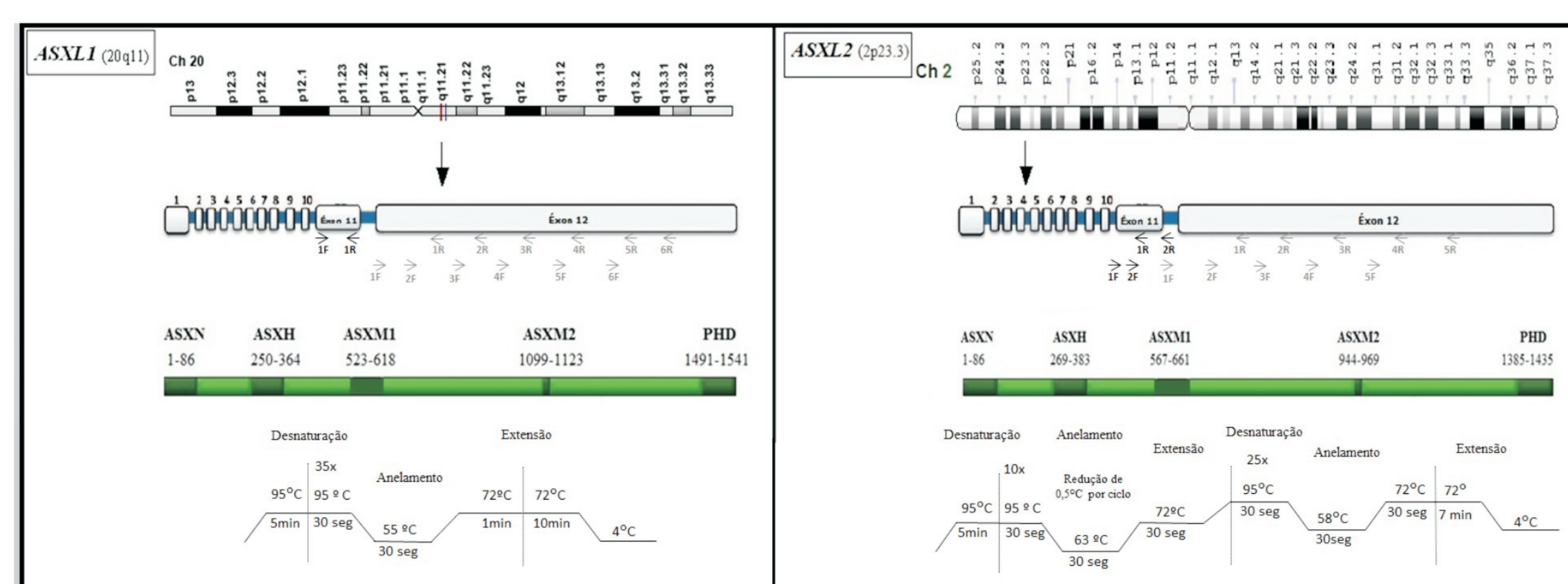
**Figura 1.** (A) Representação esquemática da translocação t(8;21)(q22;q22) resultando na formação do transcrito de fusão *RUNX1-RUNX1T1*. Em células normais, o complexo heterodimérico do fator de transcrição *CBFβ-CBFα/RUNX1* se liga à sequência do DNA TGTGGT na região reguladora da transcrição de genes alvo ativando a transcrição através do recrutamento de coativadores. Em blastos mieloídes com a fusão gênica *RUNX1-RUNX1T1*, a parte N-terminal de *RUNX1* se funde com a porção C-terminal de *RUNX1T1*. O produto de fusão *RUNX1-RUNX1T1* codifica uma proteína quimérica que é um inibidor dominante negativo da proteína *RUNX1* selvagem. (B) A inversão do cromossomo 16 resulta na quebra e reunião das bandas 16p13.1 e 16q22. A inv(16) gera a fusão gênica *CBFB-MYH11* que apresenta afinidade aumentada pela proteína *RUNX1* e inibe a atividade normal do complexo *CBFα/CBFβ*, levando a desregulação da transcrição de genes importantes da hematopoese. O bandejamento G dos cromossomos 16 normal (nl) e inv(16) está representado.

## OBJETIVOS

- Identificar os diferentes tipos de mutações em *ASXL1/2* (mutações pontuais, inserções e deleções).
- Estabelecer as associações entre a presença (ou não) de mutações nos genes *ASXL1/2* nos subtipos de LMA com as fusões *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11* e comparar com os demais subtipos de LMA pediátrica;
- Correlacionar a presença das mutações em *ASXL1/2* com as características clínico-laboratoriais dos pacientes e estabelecer o valor preditivo de prognóstico das associações.

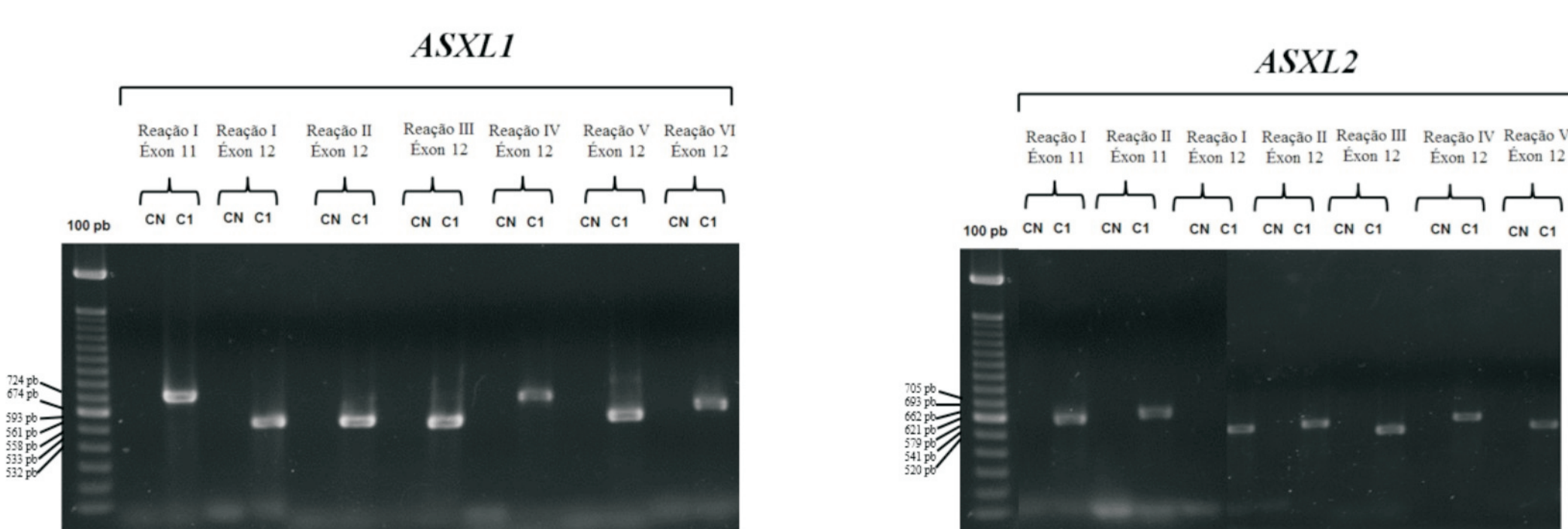
## MATERIAIS E MÉTODOS

A identificação das fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFB-MYH11* foi realizada através da técnica de RT-PCR a partir do material genético de blastos da medula óssea. As mutações nos éxons 11 e 12 dos genes *ASXL1/2* estão sendo rastreadas através da técnica de sequenciamento direto, após amplificação da região de interesse por PCR (Figura 2). Os cálculos de frequência e análises univariadas buscando a associação entre as mutações e as características clínico-laboratoriais foram realizadas através dos testes de  $\chi^2$  e teste exato de Fisher no programa SPSS 18.0.



**Figura 2.** Representação esquemática dos genes *ASXL1* e *ASXL2* e sua estrutura proteica. O gene *ASXL1* se localiza na região cromossômica 20q11.21 e o gene *ASXL2* na região 2p23.3, ambos possuindo 12 éxons. A proteína *ASXL* possui um domínio *ASXH* localizado na região N-terminal, um domínio *ASXH* na região N-terminal adjacente, domínios *ASXM1* e *ASXM2* na região média e um domínio *PHD* na região C-terminal. Os números de resíduos de aminoácidos que delineiam os domínios da proteína estão indicados na figura. As setas representam as regiões de amplificação dos primers forward (F) e reverse (R) dos éxons 11 e 12 dos genes *ASXL1/2*. As condições de ciclização estão representadas na parte inferior da figura.

A Padronização da técnica de PCR para os genes *ASXL1/2* foi realizada a partir de amostras de DNA de doadores saudáveis (controles). Os éxons 11 e 12 do gene *ASXL1* foram amplificados seguindo o descrito por Gelsi-Boyer et al., (2009) utilizando pelo menos 5 ng de DNA. Para amplificar os éxons 11 e 12 do gene *ASXL2* foram utilizados 20ng de DNA para um volume total de 25 $\mu$ l seguindo o descrito por MICOL et al. (2014). Posteriormente, os produtos foram visualizados em géis de agarose a 2% pela técnica de eletroforese. Os géis foram corados utilizando-se uma solução contendo 0,5  $\mu$ g/mL de EtBr (Figura 3)



**Figura 3.** Géis de agarose a 2% corados com uma solução de brometo de etídio; (pb) pares de bases; CN, controle negativo da reação; C1 mostra 1 controle.

## RESULTADOS

**Tabela 1.** Características demográficas e laboratoriais dos 47 casos de LMA-CBF

Características das LMAs	n/n total (%)
Idade (meses)	≤ 24: 4/47 (8,5)
	>24 -120: 21/47 (44,7)
	>120: 22/47 (46,8)
Gênero	Masculino: 22/47 (46,8)
	Feminino: 25/47 (53,2)
Cor da pele	Branca: 19/47 (40,4)
	Não-Branca: 28/47 (59,6)
Região Geográfica	Nordeste: 21/47 (44,7)
	Centro-Oeste: 16/47 (34,0)
	Sudeste: 8/47 (17,0)
	Sul: 2/47 (4,3)
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /L)	Norte: 0/47 (0,0)
	0/47 (0,0)
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /L)	≤50: 32/47 (68,1)
	>50: 15/47 (31,9)
Subtipo morfológico	LMA sem maturação (M1): 3/47 (6,4)
	LMA com maturação (M2): 20/47 (42,6)
	LMA mielomonocítica (M4): 21/47 (44,7)
	LMA sem especificação: 3/47 (6,4)
Alterações tipo I*	Presença: 18/34 (52,9)
	Ausência: 16/34 (47,1)

\*As alterações tipo I incluem mutações nos genes *K/N-RAS*, *FLT3*, *c-KIT* e *PTPN11*. LMA, leucemia mieloide aguda; n = número de casos positivos

**Tabela 2.** Caracterização clínico-laboratorial dos casos com LMA apresentando a fusão gênica *CBFB-MYH11* versus *RUNX1-RUNX1T1*

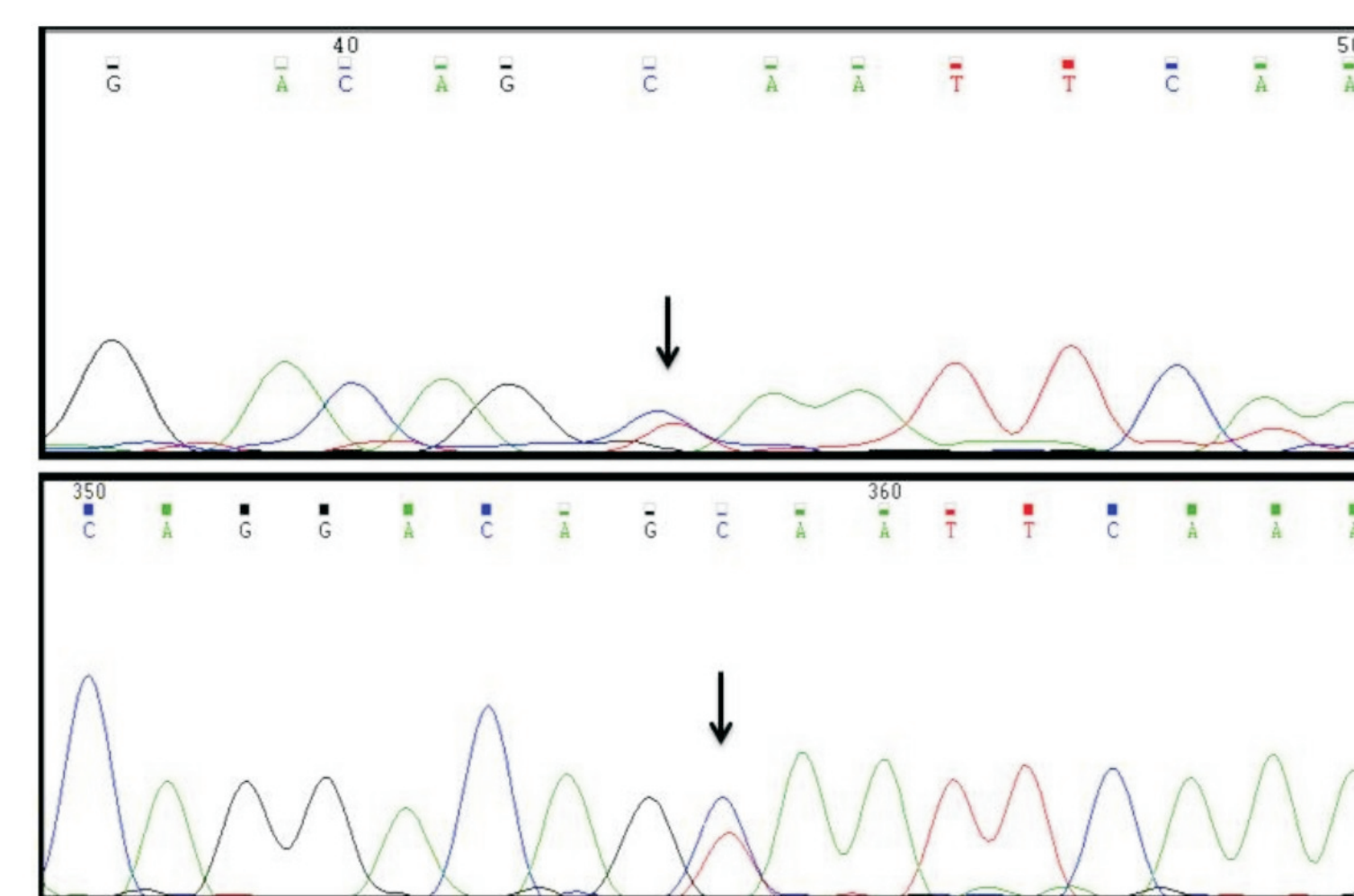
	<i>CBFB-MYH11</i> n(%)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> n(%)	p
Idade (meses)	≤ 24: 2 (15,4)	2 (5,9)	0,157
	>24 -120: 3 (23,1)	18 (52,9)	
	>120: 8 (61,5)	14 (41,2)	
Gênero	Masculino: 4 (30,8)	18 (52,9)	0,173
	Feminino: 9 (69,2)	16 (47,1)	
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /L)	≤50: 4 (30,8)	28 (82,4)	<0,001
	>50: 9 (69,2)	6 (17,6)	
Cor da pele	Branca: 4 (30,8)	15 (44,1)	0,404
	Não-Branca: 9 (69,2)	19 (55,9)	
Subtipo morfológico	LMA sem maturação (M1): 0 (0,0)	3 (8,8)	0,0004
	LMA com maturação (M2): 0 (0,0)	20 (58,8)	
	LMA mielomonocítica (M4): 12 (92,3)	9 (26,5)	
	LMA sem especificação: 1 (7,7)	2 (5,9)	

LMA, leucemia mieloide aguda

**Tabela 3.** Caracterização clínico-laboratorial dos casos de LMA-CBF apresentando as alterações de classe I

	Presente* n(%)	Ausente n(%)	p
Idade (meses)	≤24: 3 (16,7)	0 (0,0)	0,033
	>24 -120: 10 (55,6)	5 (31,2)	
	>120: 5 (27,8)	11 (68,8)	
Gênero	Masculino: 10 (55,6)	8 (50,0)	0,746
	Feminino: 8 (44,4)	8 (50,0)	
Leucometria (x10 <sup>9</sup> /L)	≤50: 12 (66,7)	9 (56,2)	0,533
	>50: 6 (33,3)	7 (43,8)	
Cor da pele	Branca: 6 (33,3)	7 (43,8)	0,533
	Não-Branca: 12 (66,7)	9 (56,2)	
Subtipo morfológico	LMA sem maturação (M1): 1 (5,6)	1 (6,2)	0,715
	LMA com maturação (M2): 6 (33,3)	6 (37,5)	
	LMA mielomonocítica (M4): 11 (61,1)	8 (50,0)	
	LMA sem especificação: 0 (0,0)	1 (6,2)	

\*As alterações tipo I incluem mutações nos genes *K/N-RAS*, *FLT3*, *c-KIT* e *PTPN11*. LMA, leucemia mieloide aguda.



**Figura 4.** Parte da sequência do éxon 12 do gene *ASXL1* do caso 199/16. Idade de 60 meses, sexo feminino apresentando a fusão gênica *CBFB-MYH11*. O polimorfismo rs4911231(C/T) p.Ser1253= está indicada pela seta nas fitas forward (superior) e reverse (inferior).

S. Schnittger et al. identificaram o polimorfismo rs4911231(C/T) p.Ser1253= com uma frequência de 61,5% numa coorte de 302 indivíduos saudáveis (grupo controle) pertencentes a região de Augsburg, Alemanha. (S Schnittger et al., 2013)

## PERSPECTIVAS

Pretendemos estabelecer as associações entre a presença de mutações nos genes *ASXL1/2* na de LMA-CBF incluindo, para isso, um grupo de comparação de LMAs com os demais subtipos genéticos. Pretendemos realizar estimativas das distribuições de sobrevida global (SG) pelo método de Kaplan-Meier e comparar os grupos com e sem mutações através do teste exato de Log-Rank.