

ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA REGIÃO CROMOSSÔMICA 13q14 EM PACIENTES COM RETINOBLASTOMA

Vanessa dos Santos Mendonça Silva^{1,2} (IC), Hector N. Seuanes Abreu² (Orientador)

¹Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

² Programa de Genética, CPQ, Instituto Nacional de Câncer

INTRODUÇÃO

O retinoblastoma é um tumor ocular maligno que se apresenta, geralmente, no primeiro ou segundo ano de vida. As manifestações clínicas mais frequentes são a leucocoria (em 60% dos casos), que corresponde a um reflexo pupilar branco e o estrabismo. O retinoblastoma pode ocorrer de forma esporádica, quando causada por duas mutações somáticas no gene *RB1* nos retinoblastos (em 60% dos casos) ou hereditária (em 40% dos casos), quando o paciente é portador de uma mutação constitucional no gene *RB1* e uma mutação somática nos retinoblastos. O *RB1* é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína nuclear que atua na regulação do ciclo celular. Grande parte das mutações constitutivas encontradas são substituições de um ou poucos nucleotídeos, porém, em alguns casos é possível encontrar grandes deleções e duplicações do gene *RB1* que pode atingir a região cromossômica 13q14, onde o gene está localizado.

OBJETIVOS

- Identificar, por meio de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) alterações na região 13q14 não detectadas pela metodologia de sequenciamento direto em amostras de DNA de pacientes com retinoblastoma.
- Contribuir ao Programa de Aconselhamento Genético em Câncer do INCA

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi inserido no projeto "Estudos Cito-moleculares em Retinoblastoma" (protocolo 40/00), aprovado desde 2001 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado por todos os participantes foi modificado e aprovado novamente pelo CEP em 2008.

Foram analisadas amostras isoladas de DNA de vários pacientes com retinoblastoma que não apresentavam alterações no gene *RB1* por sequenciamento direto. A técnica de MLPA foi realizada com o Kit SALSA MLPA P047 RB1 de acordo com as especificações do fabricante. A reação de MLPA ocorre como mostrado na Figura 1.

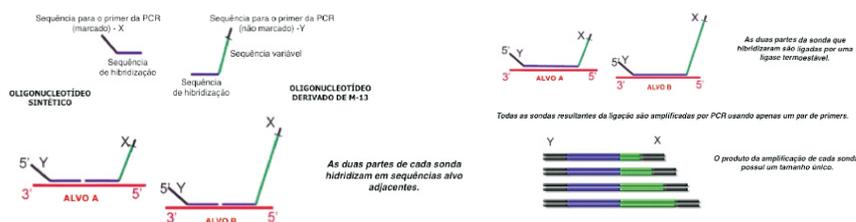


Figura 1: Reação de MLPA para diferentes alvos do gene *RB1* e genes adjacentes. Cada alvo gera um fragmento de um determinado tamanho.

Quando necessário, os resultados foram confirmados mediante MLPA para a região 11p15.4-5, cariotipagem ou hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

RESULTADOS

Até o momento, a reação de MLPA para 13q14 foi realizada para analisar amostras de 46 pacientes, apresentando resultados em 31 amostras. A maioria das reações que não funcionaram deviam-se à fragmentação do DNA. Em seis casos foram encontradas alterações que são descritas na Tabela 1 e representadas graficamente na Figura 2. Não foram encontradas alterações em 25 pacientes analisados.

Paciente	Sexo	Presentação	Idade no Diagnóstico	Resultado
P48	Masculino	Bilateral	8 meses	Amplificação do exon 12 ao exon 17 do gene <i>RB1</i>
P20	Masculino	Bilateral	12 meses	Deleção em heterozigose do exon 2a do gene <i>SMPD1</i> (11p15.4), sem alterações no gene <i>RB1</i>
P28	Masculino	Bilateral	9 meses	Deleção do exon 23 do gene <i>RB1</i>
P49	Feminino	Bilateral	17 meses	Deleção completa de um alelo do gene <i>RB1</i> e parcial dos genes <i>ITM2B</i> , <i>RCBT2</i> , <i>PCDH8</i> e <i>DLEU1</i> (13q14.2) e <i>ENOX1</i> (13q14.11)
P53	Feminino	Unilateral	20 meses	Deleção em heterozigose de todo o gene <i>RB1</i> e parcial dos genes <i>ITM2B</i> e <i>RCBT2</i> (13q14.2)
P12	Masculino	Unilateral	17 meses	Deleção total de uma cópia do gene <i>RB1</i> e de parte dos genes <i>ITM2B</i> , <i>RCBT2</i> , <i>PCDH8</i> e <i>DLEU1</i> (13q14.2)

Tabela 1: Alterações encontradas através do MLPA utilizando o kit SALSA MLPA P047 e caracterização dos pacientes de acordo com o sexo, lateralidade do tumor e idade no diagnóstico.

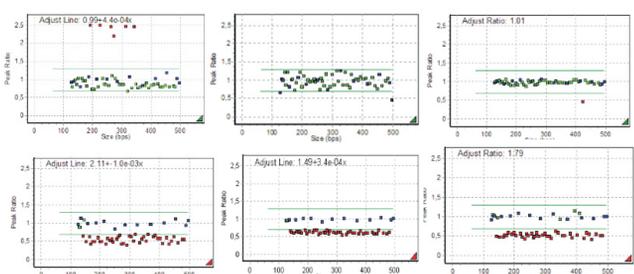


Figura 2: Resultado das reações de MLPA. A) amplificação de seis exons consecutivos observada no paciente P49. B) deleção do gene *SMPD1* (11p15.4) apresentada no paciente P20. C) deleção do exon 23 do gene *RB1* encontrada no paciente P28. D, E, F) deleção completa de um alelo do gene *RB1* observada nos pacientes P49, P53 e P12.

Paciente P20

Ainda não foram descritas associações do gene *SMPD1* (Sphingomyelin phosphodiesterase 1, localizado em 11p15.4) com retinoblastoma. Porém, o gene *SMPD2* (Sphingomyelin phosphodiesterase 2, localizado em 6q21), codifica a enzima esfingomielinase pertencente a família de fosfodiesterases (Stoffel et al., 2007), que foi descrita em associação com fosforilação da proteína pRB (Marchesini, 2004). Para analisar outras áreas da região 11p15.4 foi realizada MLPA utilizando o kit SALSA MLPA ME030 BWS/RSS. Não foram encontradas anormalidades com esse kit (Figura 3).

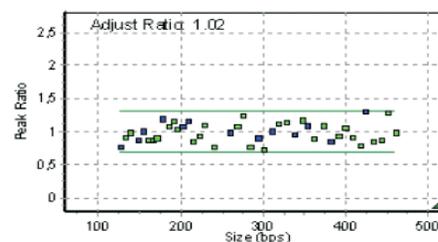


Figura 3: Resultado da MLPA realizada com o kit SALSA MLPA ME030 BWS/RSS para o paciente P20.

Paciente P53

O resultado neste paciente foi confirmado por FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) através de 2 sondas, uma que hibridiza na região 13q14 e uma específica para o gene *RB1*. Nesta, foi possível observar, tanto nas metáfases quanto nos núcleos a presença de apenas um sinal, ratificando o resultado da MLPA. Porém, com a sonda para a região 13q14 foi possível observar nos núcleos dois sinais de diferentes intensidades. Isso deve-se à condensação do DNA, que nos núcleos encontra-se em forma de cromatina, sendo menos condensado que nos cromossomos e permitindo a hibridização parcial da sonda em regiões conservadas da região 13q14 que sofreu deleção.

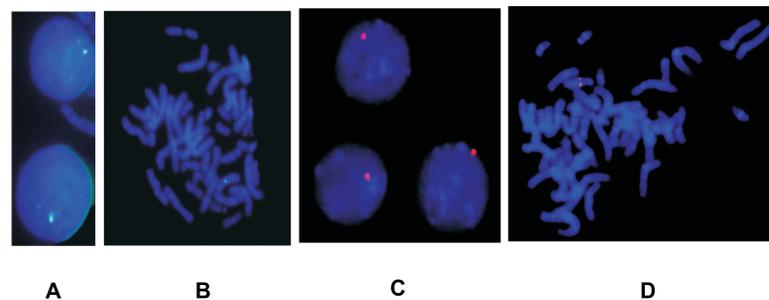


Figura 5: FISH realizado para o paciente P53. A) Sonda para a região 13q14 mostrando dois sinais de diferentes intensidades nos núcleos. B) Sonda para a região 13q14 marcando apenas um cromossomo mostrando deleção de um alelo. C, D) Sonda para o gene *RB1* mostrando a deleção de uma cópia do gene, respectivamente, em núcleos e metáfase.

Paciente P12

O resultado do paciente P12 foi confirmado através da cariotipagem mostrando uma grande deleção no cromossomo 13 (Figura 5A). Para investigar o impacto dessa alteração no aconselhamento genético, foi realizada MLPA com amostras da sua mãe utilizando o kit SALSA MLPA P047 para o gene *RB1*. Não foram detectadas anormalidades na mãe do paciente (Figura 5B). A amostra do pai ainda não foi obtida.

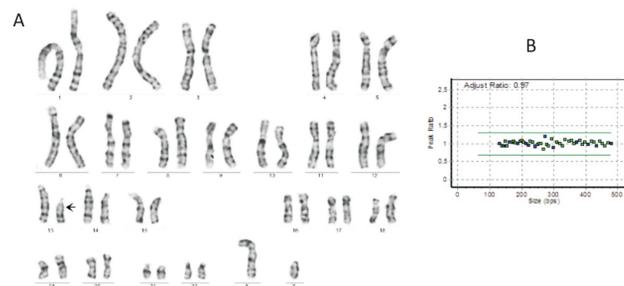


Figura 5: A) Cariótipo do paciente P12 evidenciando a deleção no cromossomo 13. B) MLPA da mãe do paciente P12 mostrando um padrão normal de número de cópias.

Foram encontradas alterações em seis pacientes, sendo quatro deles portadores de tumor bilateral e dois de tumor unilateral. O projeto possibilitará uma melhor caracterização das alterações constitucionais, ampliando o conhecimento das bases genéticas que causam o retinoblastoma, sendo, portanto, essencial para a evolução clínica dos pacientes e para aconselhamento genético das famílias atendidas pelo Programa de Aconselhamento Genético em Câncer no INCA.