

Microdissecção de novas variantes da t(12;21), uma nova fase de um estudo citogenético molecular: relato de caso



Daniela Ribeiro Ney Garcia^{1,2,4}, Elizete Nogueira dos Santos²; Roberto Capela^{2,3}; Nadezda Kosyakova⁴, Moneeb A. K. Othman⁴, Katharina Rittscher⁴,
Eliana Abdelhay^{2,3}, Raul C. Ribeiro⁵, Thomas Liehr⁴, Elaine Sobral da Costa¹, Marcelo Gerardin Poirot Land¹, Maria Luiza Macedo Silva^{2,3}

1. Programa de pós graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2. Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 3. Programa de Pós-graduação do INCA em Oncologia;
4. Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany; 5. Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, United States.

INTRODUÇÃO

A fusão gênica *ETV6/RUNX1* é uma das alterações citogenéticas mais comuns na Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) da infância, ocorrendo em 19 a 27% dos pacientes pediátricos. Esta alteração é dificilmente detectada pelo estudo citogenético convencional com bandeamento G, sendo frequentemente encontrado em perfis cariotípicos normais e com hiperdiploidia alta (>51 cromossomos) e relacionada a um excelente prognóstico. Porém a presença da fusão gênica *ETV6/RUNX1* tem sido encontrada em pacientes com recaída tardia. Além disso, os estudos tem sugerido variantes da fusão *ETV6/RUNX1* assim como heterogeneidades envolvendo perdas, ganhos de sinais dos genes *EVT6*, *RUNX1* e/ou desta fusão gênica podem influenciar o risco de recaída. Estes achados denotam que permanece a necessidade de estudos que possam apresentar novos indicadores de prognóstico para este grupo de pacientes.

OBJETIVOS

Nosso objetivo foi Neste trabalho, nós descrevemos uma metodologia alternativa utilizada na investigação citogenética de um paciente com LLA-B da infância.

PACIENTES E MÉTODOS

A amostra de medula óssea de um menino de dois anos de idade apresentando sintomas clínicos compatíveis com LLA e imunofenótipo de LLA-pré-B com marcadores mielóides foi encaminhada ao CEMO-INCA para investigação citogenética. A análise citogenética por bandeamento G revelou material adicional no braço p do cromossomo 12. Para a caracterização do perfil cariotípico do paciente foi necessária a aplicação de diferentes técnicas de hibridização in situ incluindo sondas lócus específicas (LSI), paintings, e sondas confeccionadas a partir de cromossomos bacterianos artificiais (BACs), além do bandeamento multicolorido (MCB).

RESULTADOS

O rastreamento com sondas LSI para anormalidades gênicas recorrentes na LLA da infância revelou com sonda *MLL* break-apart revelou que esse gene foi translocado integralmente para o braço p do cromossomo 12. A análise com sonda *ETV6/RUNX1* fusion, revelou a presença desta fusão no cromossomo derivativo 21 com perda de sinal de *ETV6* (fig.1A). Foram, então, aplicadas sondas de painting para os cromossomo 11, 12 e 21 que revelaram uma translocação envolvendo os cromossomos 11, 12 e 21 e também revelou que o derivativo de 12 que acreditava-se estar envolvido nesta three-way estaria, na realidade, envolvido com outro cromossomo.

O cariótipo com bandeamento G foi, então, revisado e cromossomos putativos foram testados com sondas de painting, quando foi observado a presença de um sinal do cromossomo 7 no outro der(12). A técnica de MCB foi aplicada para os cromossomos 7, 11, 12 e 21 a fim de definir os pontos de quebra (fig.3) e o cariótipo citogenético final molecular do clone anormal foi definido como:

46,XY, t(11;12;21)(q23;p13;q22),der(12)t(7;12)(p15;p12)del(12)(p12). As regiões que apresentaram novos rearranjos putativos foram então microdissecadas (Fig.4).

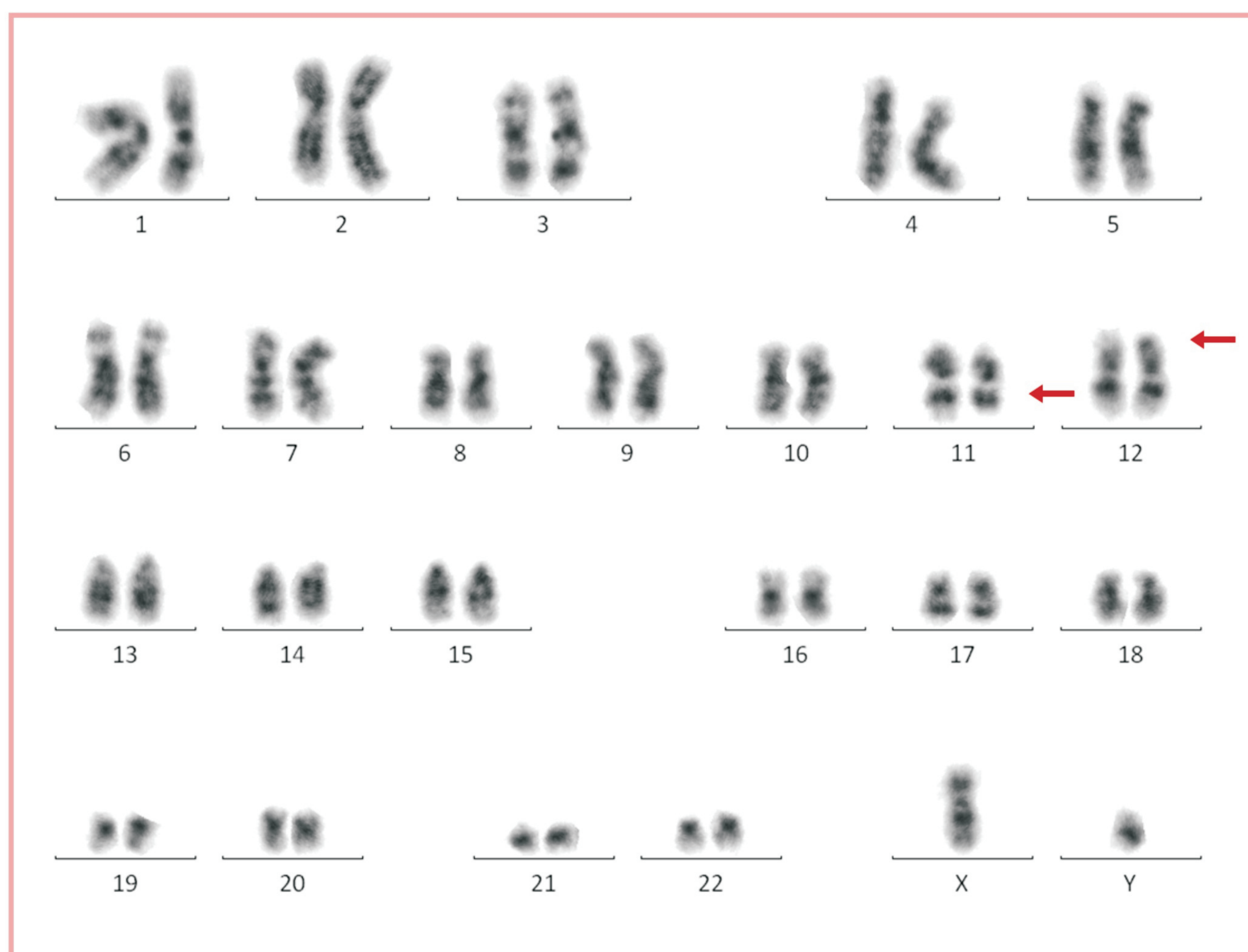


Fig.1: Cariótipo por bandeamento G mostrando cromossomos derivativos der(11) com perda da região 11q23 e der(12) com material cromossômico adicional no braço p. (setas)

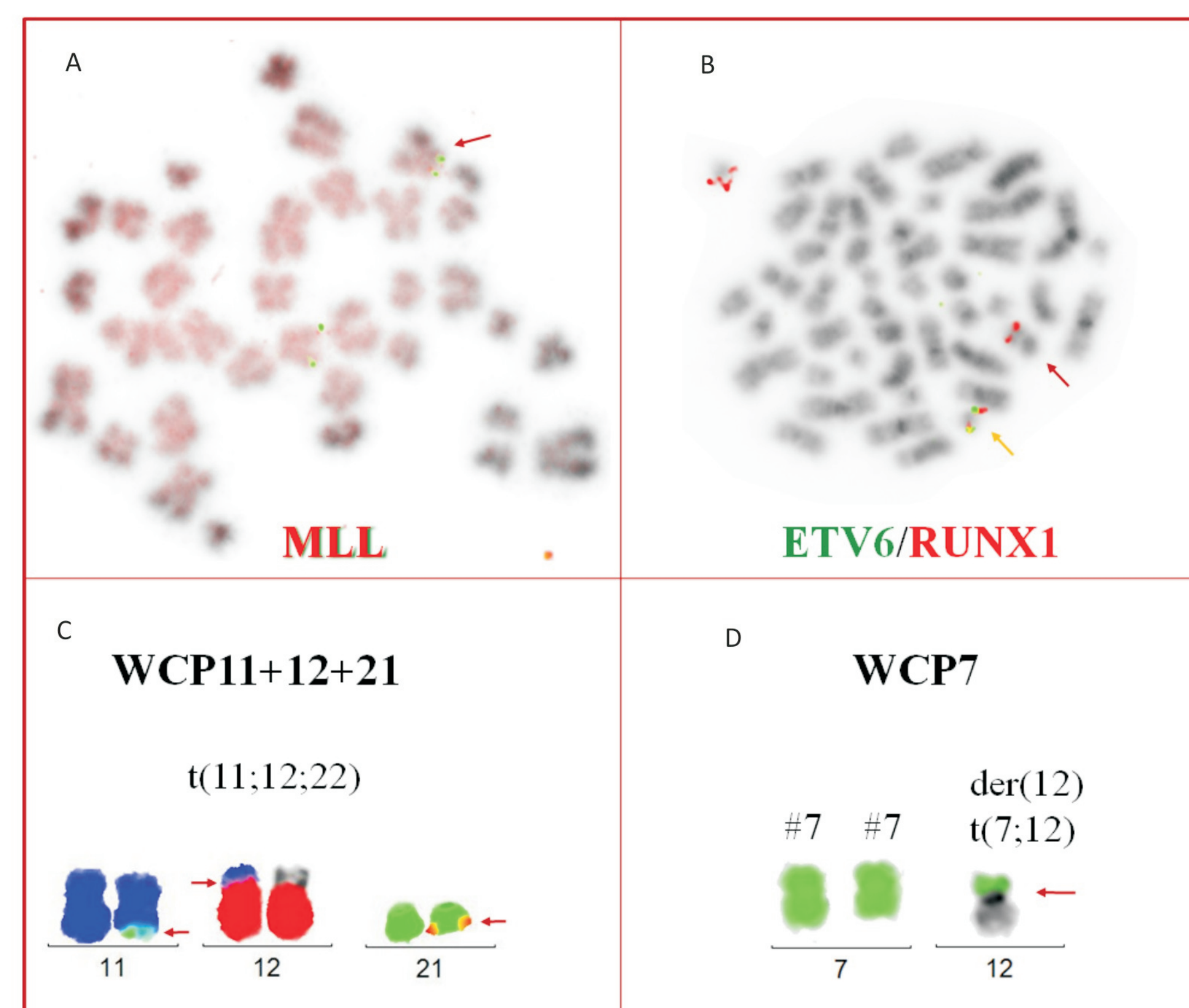


Fig.3: A: LSI-FISH para o rearranjo do gene *MLL* mostrando que este foi integralmente translocado para o braço p de um cromossomo do grupo C (seta); B: LSI-FISH para a fusão gênica *ETV6/RUNX1* mostrando a presença da fusão gênica no der(21) e a presença de um sinal de *RUNX1* no braço q do cromossomo do grupo C. C: painting conjugado para os cromossomos 11,12 e 21, mostrando a presença da translocação t(11;12;21) e material cromossômico não identificado no braço p de um der(12). D: painting para o cromossomo 7 mostrando presença de material cromossômico do 7 no der(12).

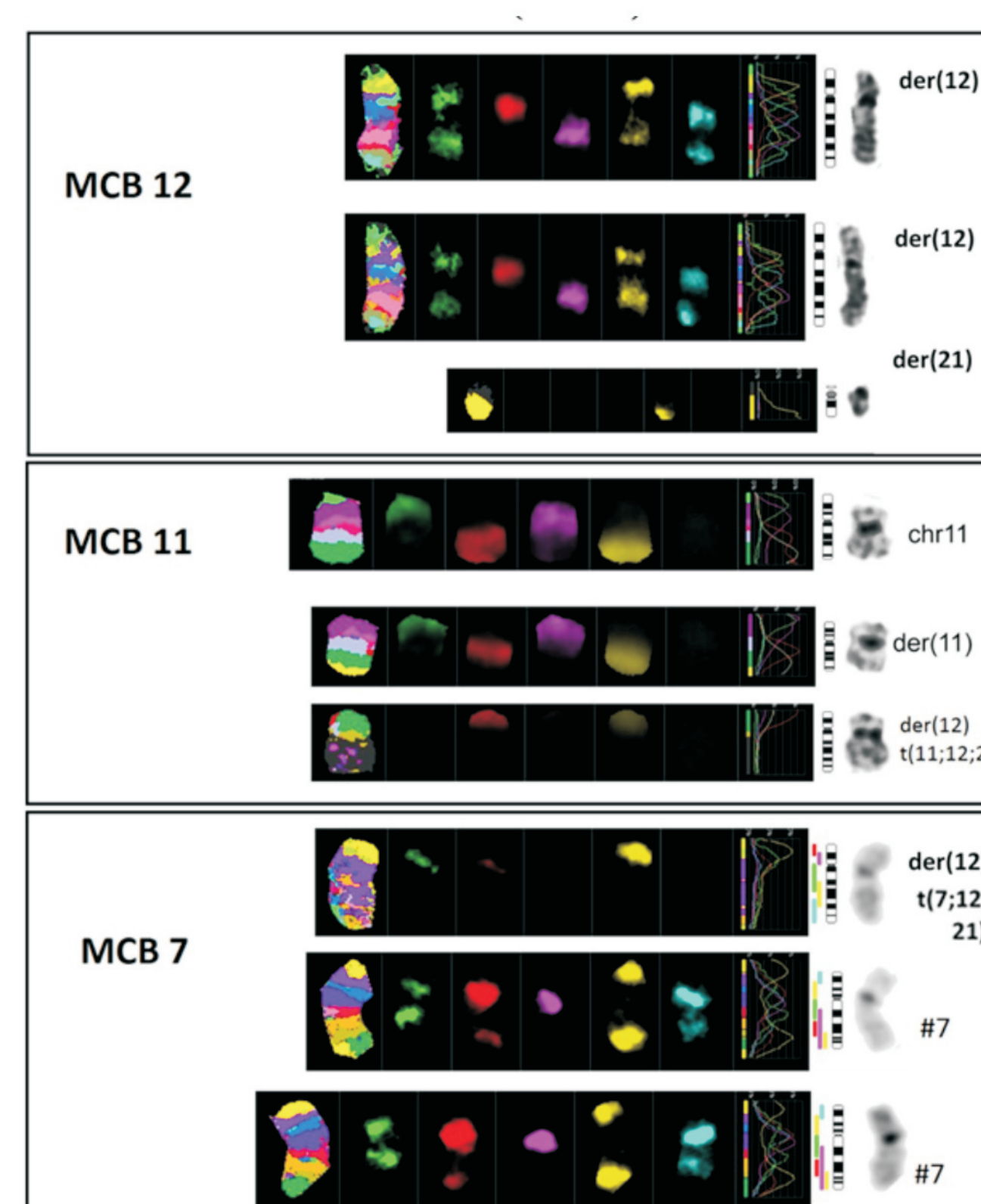


Figura 3: MCB para o cromossomo 12 mostrando presença de material cromossômico extra em ambos os der(12) e translocação da região 12p13-pter no der(21). MCB para o cromossomo 11 mostrando translocação da região 11q23-qter para o o braço p do der(12)t(11;12;21); MCB pro crmossomo 7 mostrando trissomia parcial da região 7p15

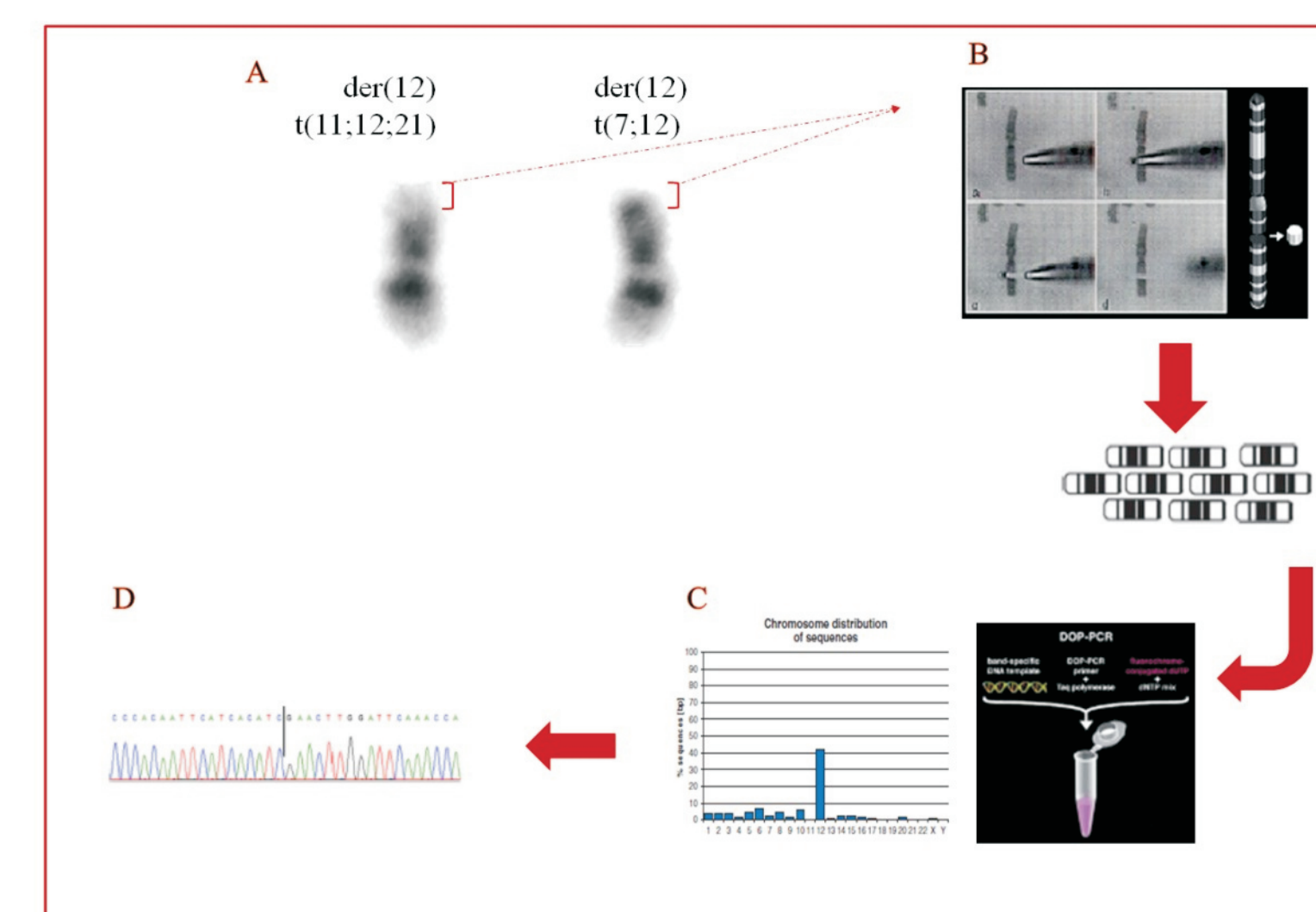


Fig.4: As regiões de interesse foram microdissecadas (A-B), os fragmentos obtidos foram submetidos à técnica de DOP-PCR (C). O DOP-PCR que permite a amplificação das regiões sectionadas, estas serão posteriormente submetidas a estudos subsequentes e as fusões presentes serão sequenciadas (D).

DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A perda do segundo sinal de *ETV6* é um evento recorrente em pacientes *ETV6/RUNX1* positivos. Geralmente, não são identificados envolvimento de outros cromossomos neste tipo de heterogeneidade envolvendo a t(12;21). Apenas um outro caso descrevendo uma three-way t(11;12;21) também descrita pelo nosso grupo, porém diferente deste a t(11;12;21) estava cripticamente presente em um der(12), com ponto de quebra diferente no cromossomo 11. Através o métodos aplicados neste estudo, até o momento, permitiu a caracterização de uma nova variante complexa da fusão *ETV6/RUNX1* que apresentou o envolvimento de ambos os homólogos do cromossomo 12 incluindo uma three-way criptica t(11;12;21)(q23;p13;q22). Os pontos de quebra com rearranjos putativos foram submetidos à técnica de microdissecção e métodos adicionais para identificar estas novas fusões, tais como sequenciamento, serão aplicados em seguida. Esta metodologia permite um acesso mais rápido e preciso dos pontos de quebra e rearranjos gênicos presentes. Através da metodologia aplicada, pretendemos a caracterizar as fusões gênicas putativas.