

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES PARCEIROS DE FUSÃO DO KMT2A EM 6 CASOS DE LEUCEMIA AGUDA DO LACTENTE > 12 MESES DE IDADE COM CARÍTIPOS COMPLEXOS OU CRÍPTICOS

¹Cifoni, EB; ¹Moretti AC; ¹Capela de Matos RR; ¹de Figueiredo AF; ²Ney Garcia DR; ³Ohtman MAK; ²Land MGP; ³Liehr T; ¹de Souza MLM.

¹Laboratório de Citogenética do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) – INCA, Rio de Janeiro, RJ;

²Pós Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio De Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ; ³Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena - Alemanha.

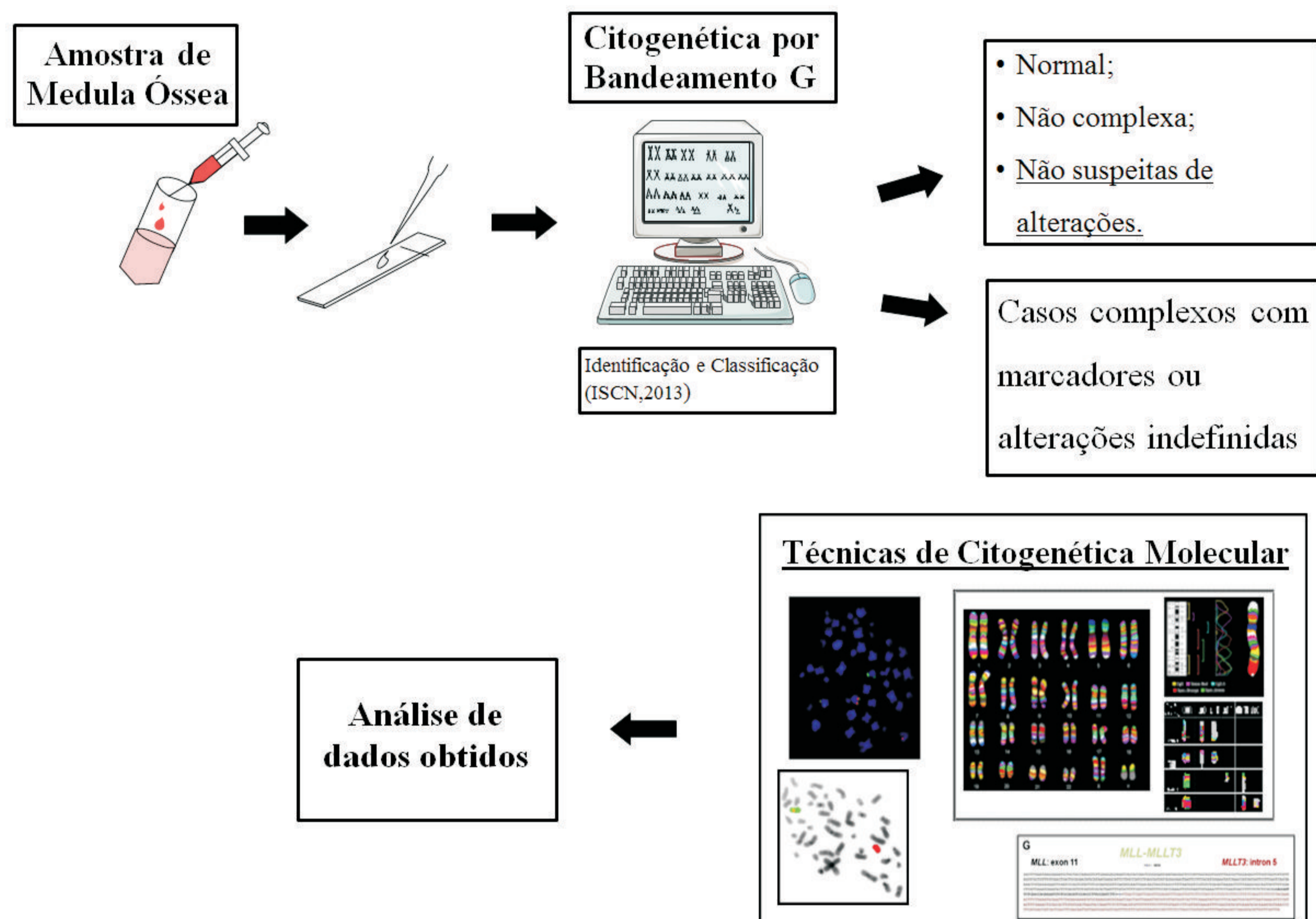
INTRODUÇÃO

A Leucemia do lactente, que corresponde à cerca de 5% das neoplasias na infância, é uma doença com características clínicas agressivas, tornando o diagnóstico acurado e tratamento adequado muito importantes. A literatura tem mostrado que 80% das crianças com leucemia aguda (LA) apresentam alterações cromossômicas. As alterações genéticas nas LA modificam vias importantes no desenvolvimento hematopoiético, alterando a sinalização ou a proliferação celular e regulação epigenética. Um importante fator de transcrição, o gene *lysine (K)-specific methyltransferase 2A* (*KMT2A*), também conhecido como *MLL*, é frequentemente observado nas translocações cromossômicas recorrentes, em Leucemias agudas pediátricas. O *KMT2A* é observado em cerca de 70% dos casos, associados com o fenótipo da doença, apresentando diferentes prognósticos, que variam de acordo com o gene parceiro envolvido na translocação. Atualmente, 80 diferentes genes parceiros diretos e 120 fusões variantes recíprocas de *KMT2A* foram caracterizados à nível molecular. Muitas vezes as anormalidades estão crípticas no cariótipo e, por isto, nem sempre o gene parceiro, que pode apresentar valor prognóstico, é identificado por citogenética convencional.

OBJETIVO

Neste trabalho, nós objetivamos elucidar e caracterizar estas anormalidades de modo a contribuir com a biologia da Leucemia aguda do lactente com menos de 12 meses de idade.

METODOLOGIA



*Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (Process Numbers 08/07 and 07/08).

RESULTADOS

Analisamos 6 pacientes lactantes com LA portadores de cariótipos sugestivo e *KMT2A* rearranjado (*KMT2A-r*). A citogenética convencional por bandeamento G revelou cariótipos não informativos e/ou complexos. Em combinação com *multicolor banding* (MCB) mostrou um alto nível de complexidade nos cariótipos desses pacientes 1, 2, 5 e 6 (Figura).

A citogenética molecular encontraram anormalidades envolvendo o *KMT2A-r* em todos os casos. Porém, o MCB mostrou que além de um parceiro de translocação recíproca envolvendo a região 11q23 num cariótipo complexo (paciente 1). Foram identificados translocações de *tree-way* simples (pacientes 3, 4 e 5), *>tree-way* translocações complexo cariótipo (pacientes 2, 4 e 6), envolvendo a região 11q23.

Os genes parceiros de fusão do *KMT2A* encontrados nos casos analisados foram as variantes *MLLT1* (paciente 2 e 4), *MLLT3* (paciente 3 e 5), e *MLLT10* (paciente 6) e a leitura recíproca da PCR Inversa de Longa Distância (LDI-PCR) também revelou fusão com o gene *PITPNA*. (paciente 3).

A cariotipagem, MCB, LDI-PCR e PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) os resultados e os pontos exatos de quebras estão descritos na Tabela.

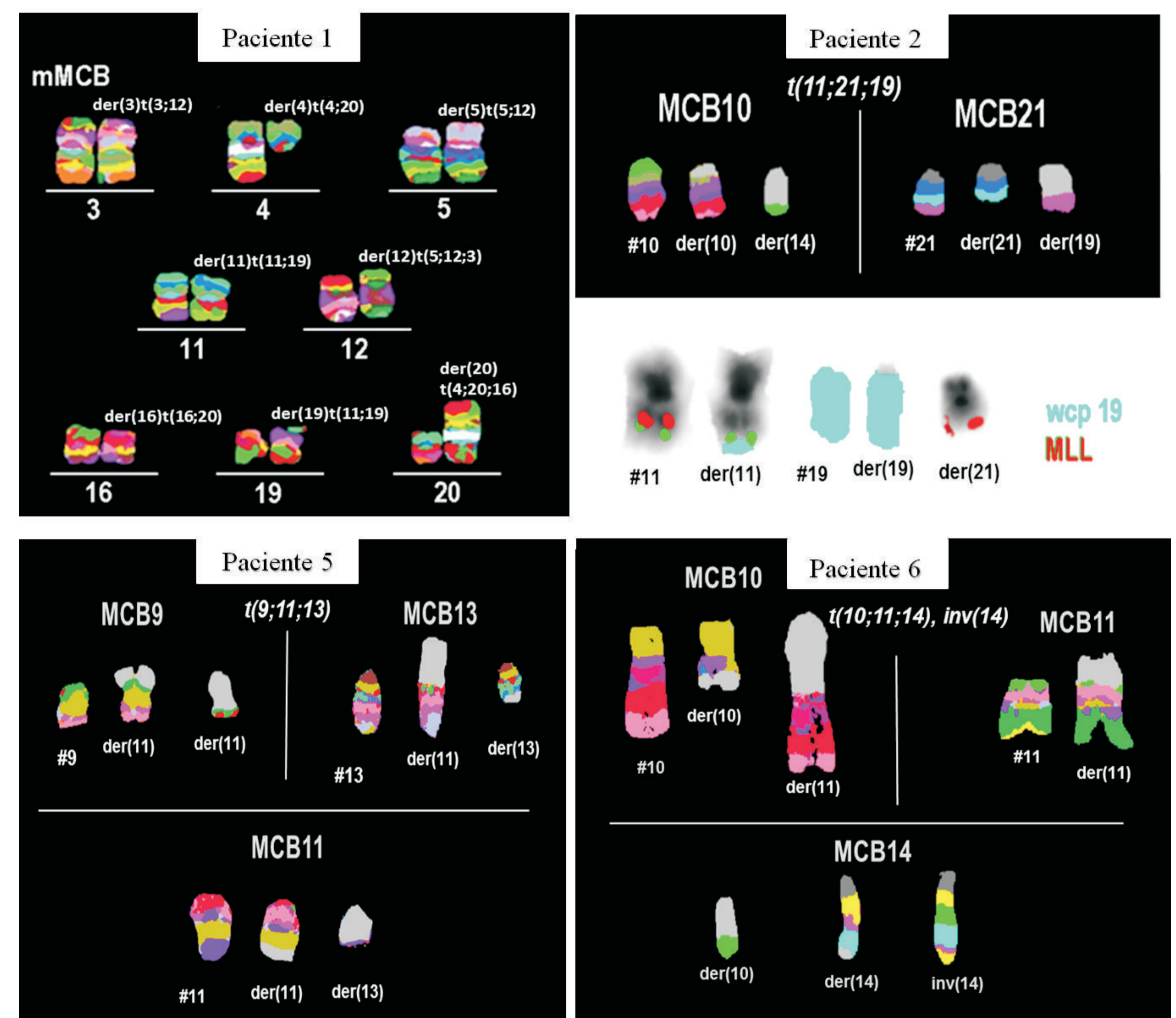


Figura: Análise citogenética molecular dos cromossomos derivados anteriormente não definidas com *KMT2A-r*. **Paciente 1:** O MCB mostrando oito cromossomos derivados (*der*) e seus cromossomos homólogos normais. O cromossomo 19 mostrou a translocação $t(11;19)$ equilibrada entre os 11q23 e 19p13. **Paciente 2:** MCB dos cromossomos 10 e 21, que mostram os derivados de cromossomos *der* (10), *der* (14), *der* (19), e *der* (21); e FISH combinando WCP do cromossomo 19 (azul) com uma sonda específica para um local *MLL* break-apart (3' *MLL* em vermelho; 5' *MLL* em verde), mostrando o *KMT2A-r* e de três vias translocação $t(11;21;19)$. **Paciente 5:** MCB de cromossomos 9, 13 e 11, mostrando três cromossomos derivados, e os cromossomos homólogos normais, mostrando a $t(9;11;13)$. **Paciente 6:** MCB dos cromossomos 10, 11 e 14, que mostram os cromossomos derivados envolvidos em um de três vias $t(10;11;14)$ e um *inv* (14) e os cromossomos homólogos normais 10 e 11. Os pontos exatos de quebras são mostrados na Tabela.

Tabela: *KMT2A-r* relacionados encontrados pela citogenética em 6 casos de leucemia aguda em lactentes.

Paciente / Idade	Bandeamento G	MCB	Rearranjos recorrentes	Gene de Fusão (RT-PCR)	MLL break / partner break (LDI-PCR)	Nº de cromossomos quebrados
1 / 4 meses	46,XX,t(11;19)(q23;p13),+2mar	46,XX,der(3)t(3;12)(p14;q13.1),der(4)t(4;20)(q13;p13.3),der(5)t(5;12)(p15.2;p13.3),t(11;19)(q23;p13),der(12)t(5;12;3)(5pter->5p15.3::12p13.3->12q13.1::3p14->3pter),der(16)t(16;20)(p11.1;q12),der(20)t(4;20;16)(4qter->4q13::20p13.3->20q12::16p11.1->16pter)	t(11;19)(q23;p13)	-	-	13
2 / 7 meses	46,XX,t(10;14)(p12;q3),t(11;21;19)(q23.3;q22)	46,XX,t(10;14)(p12;q32),t(11;21;19)(q23.3;q22),t(11;21;19)(q23;p13)	t(11;19)(q23;p13)	-	-	5
3 / 4 meses	47,XY,der(9)(p?),der(11)(q23),der(17)(p?),+X	47,XY,+X,t(9;11;17)(p23;q23;p13)	t(9;11)(p23;q23)	-	<i>KMT2A</i> intron 9 – <i>MLLT3</i> intron 5 <i>PITPNA</i> intron 4 – <i>KMT2A</i> intron 9	3
4 / 3 meses	47,XY,-4,del(11)(q23),+2mar	t(4;19;11)(q12;p13.3;q23.3)	t(4;19;11)(q12;p13.3;q23.3)	-	<i>KMT2A</i> exon12 – <i>MLLT1</i> intron1 4q12 – <i>KMT2A</i> intron11	3
5 / 5 meses	46,XY,t(9;11;13)(p?;q23;q?)	46,XY,t(9;11;13)(p21~22;q23;q14)	t(9;11)(p23;q23)	<i>KMT2A</i> / <i>MLLT3</i>	-	3
6 / 6 meses	46,XX,der(11)t(11;?) (?;q23),der(14),t(q11.?, -10, -14, +mar	46,XX,der(10)t(10;11;14)(10pter->10p12.31::11q23.3->11q23.3::10p12.31->10q11.23::14q24.2->14qter),der(11)(10;11;14)(10qter->10q24.2::11p15.3->11q23.3::10p12.31->10p12.31::11q23.3->11qter),der(14)t(10;14)(q11.23;q24.2),inv(14)(q32q11)	t(10;11)(p12;q23)	<i>KMT2A</i> / <i>MLLT10</i>	<i>KMT2A</i> intron10 – <i>MLLT10</i> intron 8 10p12 – <i>KMT2A</i> intron11	10

CONCLUSÃO

Conclui-se que a combinação de técnicas moleculares identificam eficientemente genes parceiros de fusão *KMT2A* em cariótipo complexos de LA pediátrica podendo assim contribuir uma melhor caracterização da doença.

AGRADECIMENTOS

CAPES-DAAD (419/14); CNPq (473878/2011-9), FAPERJ (E-26/110.868/2013); Ministério da Saúde (MS), Pró-Vita e Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena