IDENTIFICAÇÃO DE FUSÕES GÊNICAS EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA PEDIÁTRICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

Ingrid Sardou Cezar[1]; Francianne Gomes Andrade[1]; Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira[1]

1. Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrico (PHOP), Centro de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.

INTRODUÇÃO

- A leucemia mieloide aguda (LMA) pediátrica representa 18% dos casos de leucemias agudas pediátricas diagnosticados no mundo e, no Brasil, são responsáveis por 18-24% de todos os novos diagnósticos de câncer em indivíduos até 19 anos de idade.
- As anormalidades cromossômicas das LMAs pediátricas envolvem genes importantes para a regulação do crescimento e diferenciação celular.
- As fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11* (grupo LMA-CBF), *PML-RARα* e o rearranjo do *KMT2A (KMT2A*-r*)* estão associados a subtipos específicos da doença.
- As fusões gênicas do grupo LMA-CBF, *PML-RARα* e *KMT2A-r* representam um importante papel no prognóstico, sendo marcadores únicos e estáveis para acompanhamento da resposta ao tratamento.
- As fusões que englobam o grupo LMA-CBF e a *PML-RARα* conferem um bom prognóstico. O gene *KMT2A* apresenta uma grande variedade de parceiros de fusão com o prognóstico variável, dependendo do parceiro envolvido. Diante disso, a Organização Mundial de Saúde recomenda a identificação dessas alterações moleculares.

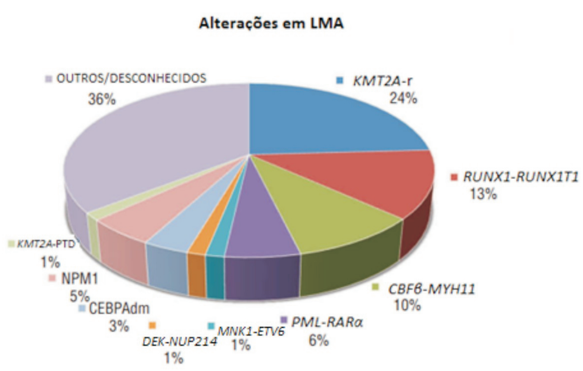

Figura1- Frequência das principais alterações genéticas em LMA pediátrica. Outros/desconhecidos= = casos de cariótipo normal ou que as técnicas molecurales falharam. Adaptado de BALGOBIND et al., Haematologica, 2011.

OBJETIVOS

- Estabelecer a técnica de RT-PCR *multiplex* para a identificação dos principais parceiros de fusão do *KMT2A*;
- Identificar fusões gênicas somáticas mais frequentes em LMA através das técnicas moleculares RT-PCR convencional, *nested* RT-PCR e RT-PCR *multiplex*;
- Testar se existe correlação entre as LMAs com fusões gênicas específicas e as características clínicas demográficas dos pacientes.

METODOLOGIA

Foi analisada uma série de 318 casos de LMA *de novo* (⩽ 21 anos de idade), diagnosticados no período de 2010-2016. Dentre as crianças com leucemia aguda promielocítica (APL), foi analisada exclusivamente a fusão *PML-RARα* pela técnica de *nested RT-PCR*. Os casos com os demais subtipos foram encaminhados para a pesquisa das fusões do grupo LMA-CBF por RT-PCR convencional e, as que obtiveram resultado negativo para essas fusões, foram encaminhados para a identificação dos *KMT2A-r* através de RT-PCR *multiplex*. Os resultados foram analisados através dos testes estatísticos χ^2 e teste exato de Fisher.

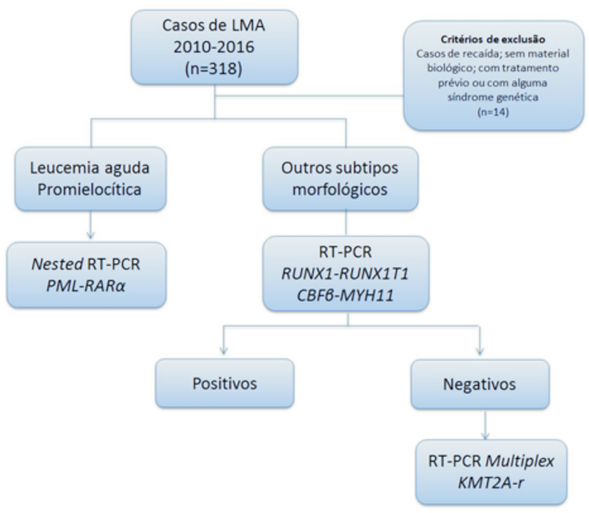

Figura 2. Organograma da metodologia utilizada para o desenvolvimento do estudo.

RESULTADOS

Para a identificação dos *KMT2A-r*, a técnica de RT-PCR multiplex não foi bem sucedida na primeira reação para a amplificação da maioria das fusões (*KMT2A-MLLT3, KMT2A-MLLT10, KMT2A-AFF1, KMT2A-MLLT1, KMT2A-MLLT4, KMT2A-PTD*), realizada com modificações do descrito por BURMEISTER et al., *Leukemia Research*, 2014. Realizamos diversos ajustes nas concentrações dos reagentes e a para ciclagem da reação. Ao fim conseguimos estabelecer a técnica de modo confiável para todos os parceiros estudados nas seguintes condições de ciclagem: 2 min a 94 ºC, 35x de 30 seg a 94 ºC, 30 seg a 63 ºC e 1 min a 72 ºC. Utilizamos as seguintes concentrações para os reagentes: 2,5Mm de MgCl2, 0,2µl de iniciadores e 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen, USA). Os tamanhos dos fragementos esperados após a padronização da técnica estão demostrados na Tabela 1

Tabela 1. Tamanho dos fragmentos esperados para cada parceiro estudado do *KMT2A*

Parceiro do *KMT2A*	Tamanho do fragmento*
MLLT3	451 pb
MLLT4	603 pb
MLLT1	606 pb
MLLT10	478 pb
AFF1	441 pb
PTD	759 pb

*O tamanho do fragmento pode ter variações dependo do transcrito.**pb= pares de base.

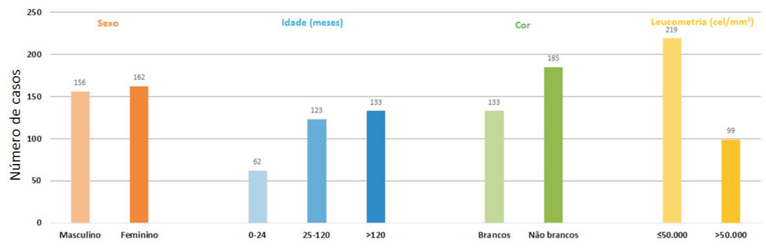

Figura 3. Características clínico-demográficas dos pacientes com LMA.

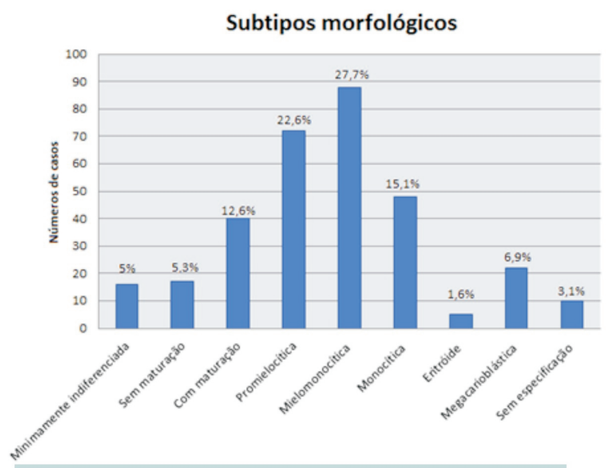

Figura 4. Frequência dos subtipos morfológicos nos casos estudados.

Tabela 2. Características clínico-demográficas dos pacientes com fusão do grupo LMA-CBF

Características	Total, n(%)	LMA-CBF*		p valor
		POS, n(%)	NEG, n(%)	
Idade (meses)				
0-24	58(24,2%)	4 (7,5%)	54(28,9%)	
25-120	90(37,5%)	25(47,2%)	65(34,8%)	0,006
>120	92(38,3%)	24 (45,3%)	68 (36,4%)	
Sexo				
Masculino	115(47,9%)	24(45,3%)	91(48,7%)	0,391
Feminino	125(52,1%)	29(54,7%)	96(51,6%)	
Cor da pele				
Brancos	97(40,4%)	22 (41,5%)	75(40,1%)	0,488
Não-brancos	143(59,6%)	31(58,5%)	112(59,9%)	
Leucometria (céls/ml)				
≤50.000	165(68,8%)	35(66%)	130(69,5%)	
>50.000	75 (31,3%)	18(34%)	57(30,5%)	0,373
Subtipo morfológico				
LMA minimamente indiferenciada	15 (6,3%)	0 (0%)	15 (8%)	
LMA sem maturação	16 (6,7%)	4(7,5%)	12(6,4%)	
LMA com maturação	40 (16,7%)	20(37,7%)	20(10,7%)	
LMA mielomonocítica	87(36,3%)	25(47,2%)	62(33,2%)	<0,0001
LMA monocítica	46 (19,2%)	1 (1,9%)	45(24,1%)	
LMA eritróide	5 (2,1%)	0(0%)	5(2,7%)	
LMA megacarioblástica	21 (8,8%)	0 (0%)	21(11,2%)	
LMA sem especificação	10 (4,2%)	3 (5,7%)	7(3,7%)	

*CBF- Grupo *core bind factor*, incluem as fusões gênicas *RUNX1-RUNX1T1* e *CBFβ-MH11*. POS= positivo; NEG= negativo.

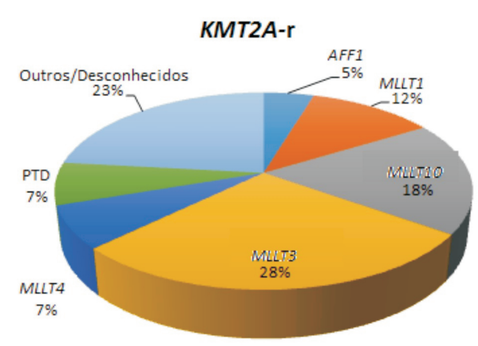

Figura 5. Frequência dos parceiros do *KMT2A* nos casos de LMA pediátrica. Outros = parceiros identificados por outras técnicas (LDI/FISH). Desconhecidos = casos positivos para o rearranjo, porém com parceiro desconhecido.

Tabela 3. Comparação clínico-demográfica entre os pacientes com a fusão *PML-RARα* e as demais fusão (grupo LMA-CBF e *KMT2A*-r)

Características	Total, n(%)	*PML-RARα*, n(%)	Outras alterações*, n(%)	p valor
Idade (meses)				
0-24	27(19,0%)	1(2,2%)	26(27,1%)	
25-120	57(40,1%)	20(43,5%)	37(38,5%)	0,001
>120	58(40,8%)	25(54,3%)	33(34,4%)	
Sexo				
Masculino	66(46,5%)	22(47,8%)	44(45,8%)	0,482
Feminino	76(53,5%)	24(52,2%)	52(54,2%)	
Cor da pele				
Brancos	62(43,7%)	17(37%)	45(46,9%)	0,175
Não-brancos	80(56,3%)	29(63%)	51(53,1%)	
Leucometria (céls/ml)				
≤50.000	98(69%)	36(78,3%)	62(64,6%)	0,071
>50.000	44(31%)	10(21,7%)	34(35,4%)	

*Outras alterações = casos positivos para *RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11* e *KMT2A-r*

Tabela 4. Características clínico-demográfica dos pacientes com *KMT2A*-r

Características	Total, n(%)	*KMT2A*-r		p valor
		Presente, n(%)	Ausente, n(%)	
Idade (meses)				
0-24	58(28,1%)	22(51,2%)	36(22,0%)	
25-120	74(35,7%)	12(27,9%)	62(37,8%)	0,001
>120	75(36,2%)	9(20,9%)	66(40,2%)	
Sexo				
Masculino	93(44,9%)	20(46,5%)	73(44,5%)	0,474
Feminino	114(55,1%)	23(53,5%)	91(55,5%)	
Cor da pele				
Brancos	87(42%)	23(53,5%)	64(39%)	0,063
Não-brancos	120(58%)	20(46,5%)	100(61%)	
Leucometria (céls/ml)				
≤	141(68,1%)	27(62,8%)	114(69,5%)	0,253
>50.000	66(31,9%)	16(37,2%)	50(30,5%)	
Subtipo morfológico				
LMA minimamente indiferenciada	14(6,8%)	4(9,3%)	10(6,1%)	
LMA sem maturação	13(6,3%)	4(9,3%)	9(5,5%)	
LMA com maturação	36(17,4%)	1(2,3%)	34(21,3%)	
LMA mielomonocítica	73(35,3%)	14(32,6%)	59(36%)	
LMA monocítica	41(19,8%)	19(44,2%)	22(13,4%)	0,001
LMA eritróide	5(2,4%)	0(0%)	5(3%)	
LMA megacarioblástica	19(9,2%)	1(2,3%)	18(11%)	
LMA sem especificação	6(2,8%)	0(0%)	6(3,7%)	

*Parceiros estudados do *KMT2A*: *MLLT3, MLLT4, MLLT10, MLLT1, AFF1* , PTD e desconhecidos.

CONCLUSÃO

- A técnica de RT-PCR *multiplex* para identificação dos principais parceiros de fusão do *KMT2A* foi estabelecida na rotina do laboratório do PHOP, após a devida adequação das concentrações dos reagentes e ajustes na ciclagem.
- As principais fusões genicas de LMA pediátrica foram identificadas de maneira rápida e confiável de acordo com as técnicas propostas.
- As frequências encontradas no presente estudo contribuem para o entendimento da biologia da doença e representam a descrição do perfil molecular dos casos de LMA em relação às fusões gênicas mais frequentes entre os casos pediátricos.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA