

# ANORMALIDADES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM UMA COORTE DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA COM DESORDENS NO CROMOSSOMO 21

Tállita Meciany Farias Vieira (DO)<sup>1</sup>, Sheila Coelho<sup>2</sup>, Gerhard Fuka<sup>1</sup>, Claire Schwab<sup>3</sup>, Christine Harrison<sup>3</sup>, Maria S. Pombo-de-Oliveira<sup>1</sup>.

1. Paediatric Haematology Oncology Programme, Instituto Nacional de Câncer, (INCA), Rio de Janeiro (tallitameciany@hotmail.com; gfuka@inca.gov.br; mpombo@inca.gov.br);

2. Molecular Carcinogenesis Program- Research Center-INCA, Rio de Janeiro (sheilacoelho@gmail.com).

3. Leukaemia Research Cytogenetics Group, Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University (claire.schwab@newcastle.ac.uk; christine.harrison@newcastle.ac.uk)

## INTRODUÇÃO

Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-cpB) constitui uma doença heterogênea. Aproximadamente 60% das LLA-cpB apresentam aberrações envolvendo o cromossomo 21 (Chr 21), incluindo Hiperdiploidia (HeH), fusão gênica *ETV6-RUNX1* e amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (iAMP21). Por outro lado, mecanismos epigenéticos são reguladores transcricionais que podem contribuir com a leucemogênese.

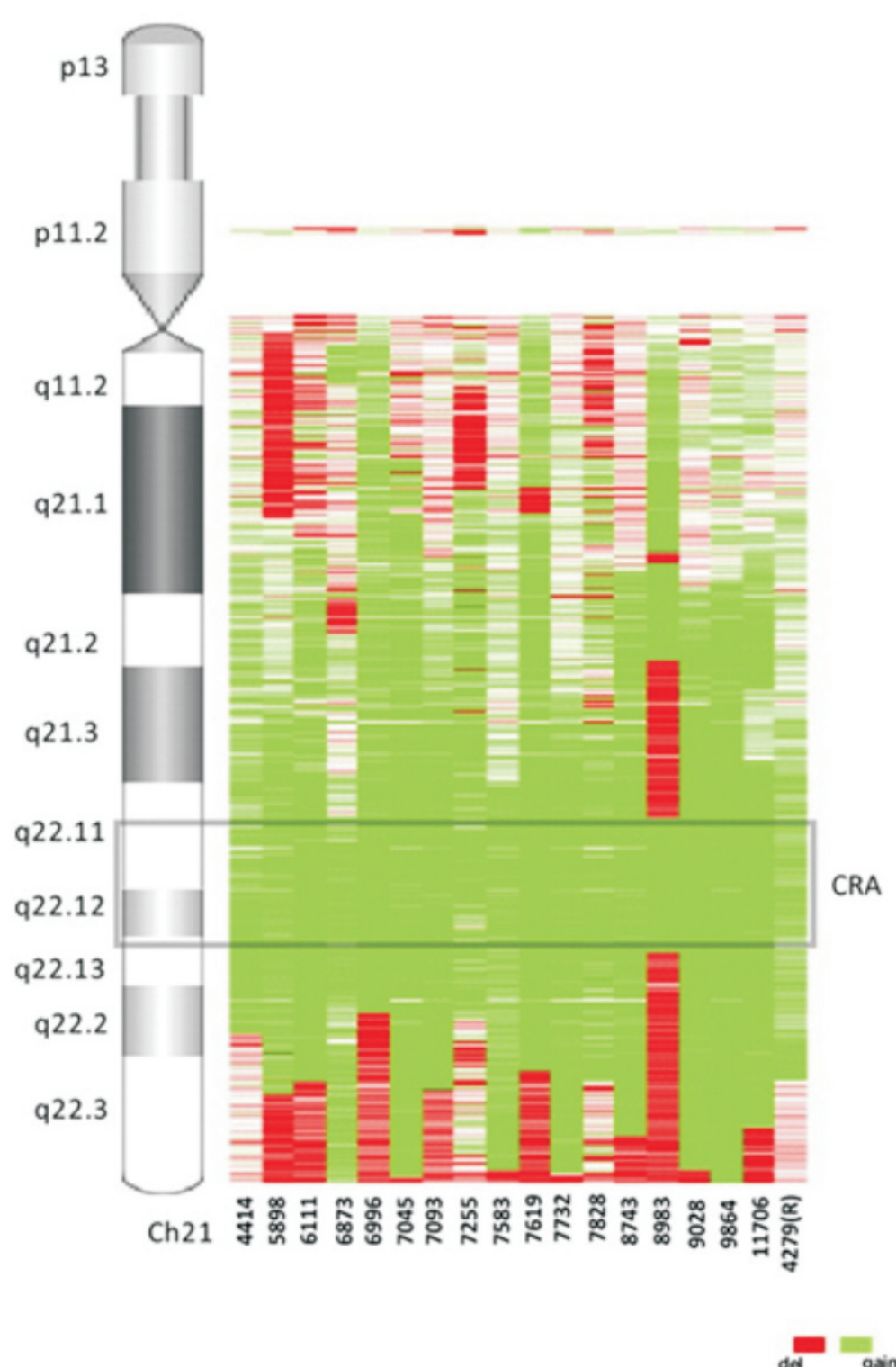


Figura 1: Heat map das anormalidades no cromossomo 21 em pacientes com iAMP21. As regiões de deleção estão representadas em vermelho, ganhos em verde e número de cópias normal em branco. Rand et al., 2011

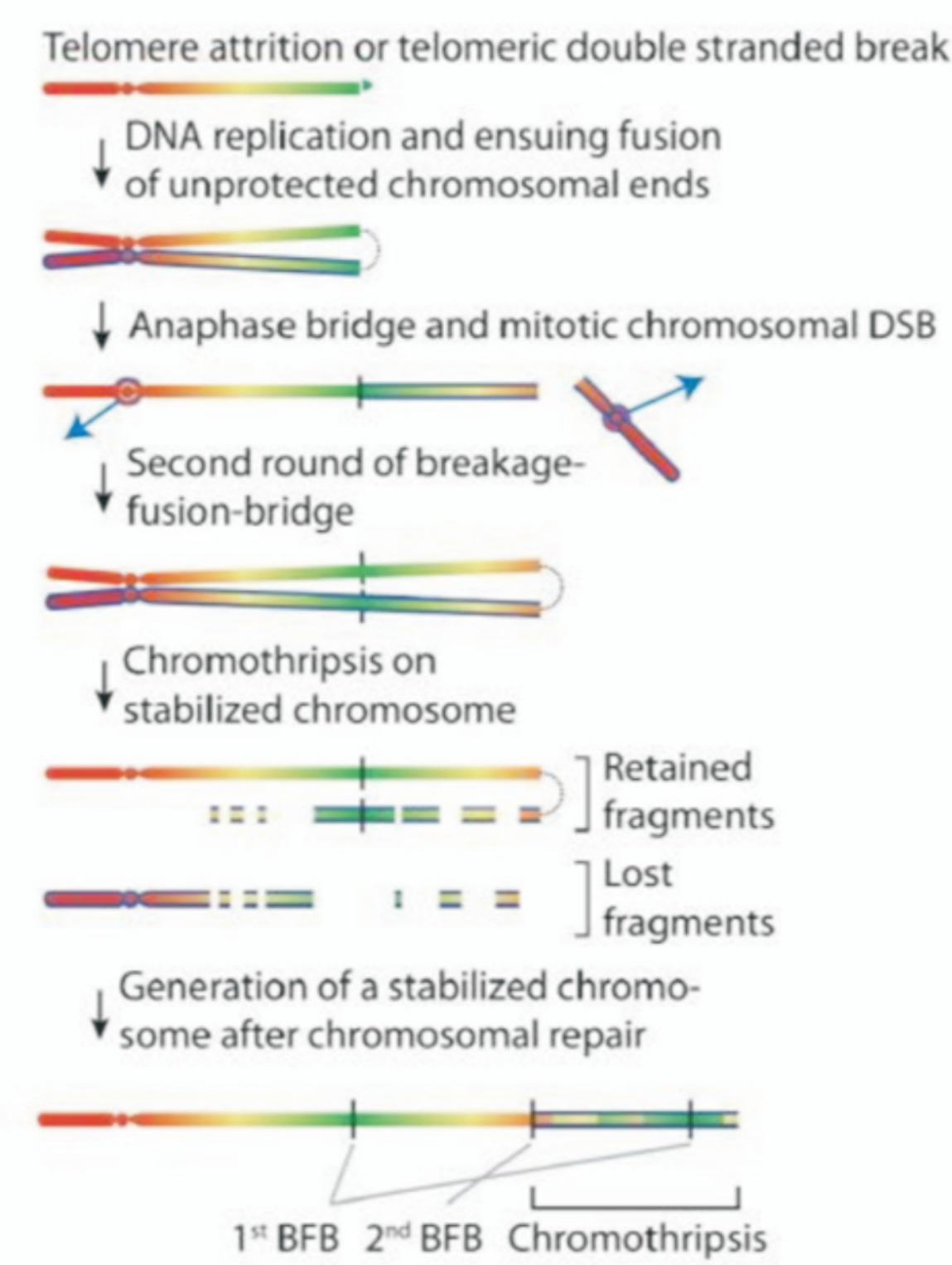


Figura 2: O modelo proposto para a evolução da iAMP21 a nível de cromossomo. Li et al., 2015.

## OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo desenvolver uma estratégia para identificar com acurácia iAMP21 dentro das LLA-cpB, assim como caracterizar o perfil de metilação entre diferentes subgrupos de LLA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 373 casos de LLA-cpB para análises de alterações em número de cópias (CNA) no Chr 21. *Multiplex ligation probe amplification* (MLPA, SALSA P327\_A1 e P327\_B1) foi realizada, seguida pela análise por FISH (LPH012 *TEL/AML1 translocation*, *dual fusion probe*) e sondas centroméricas para os Chr 4, 8, 10, 14, 17, 18, X e Y (Cytocell, Cambridge, UK). Adicionalmente, os DNA das amostras foram modificados com EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA) e analisados no HumanMethylation450 Infinium Assay (Illumina, San Diego, CA). As análises estatísticas foram realizadas no RStudio software com pacotes Bioconductor.

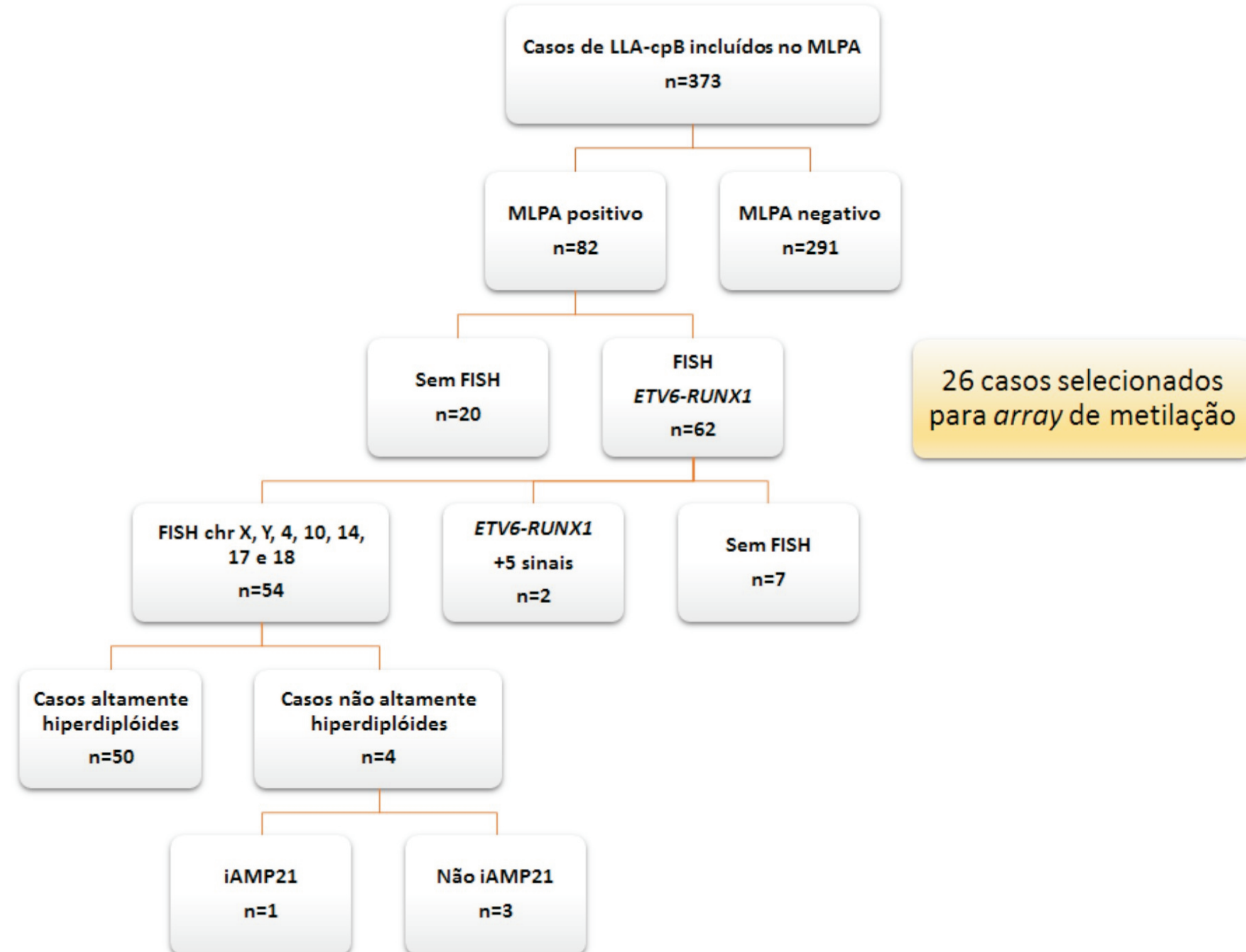


Figura 3: Representação esquemática do desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão.

## RESULTADOS

Encontramos evidências de ganhos em CNA no Chr 21 em 82 amostras (MLPA). A maior parte dos ganhos foi confirmada por FISH e 11 amostras apresentaram  $\geq 5$  sinais de *RUNX1*. Usando as sondas centroméricas, caracterizamos 53 amostras como HeH. Cópias extras do Chr 21 foram identificadas em todas as amostras assim como os seguintes ganhos, chr 4 (58%), 10 (57%), 14 (84%), 17 (53%), 18 (60%), X (86%) e Y (46%). Perda no Chr 17 (2%) e Y (4%) também foram identificadas. Dois casos com a fusão *ETV6-RUNX1* ganho do chr 21. Duas amostras foram identificadas com iAMP21 e confirmadas por FISH usando sondas centroméricas Chr 13/21 e telomérica Chr 21. A análise de metilação caso vs. controle permitiu identificar 5031 sítios CpG diferencialmente metilados (p ajustado <0,001). O perfil de metilação foi distinto entre casos e controles, enquanto o último teve perfil semelhante ao das amostras de remissão.

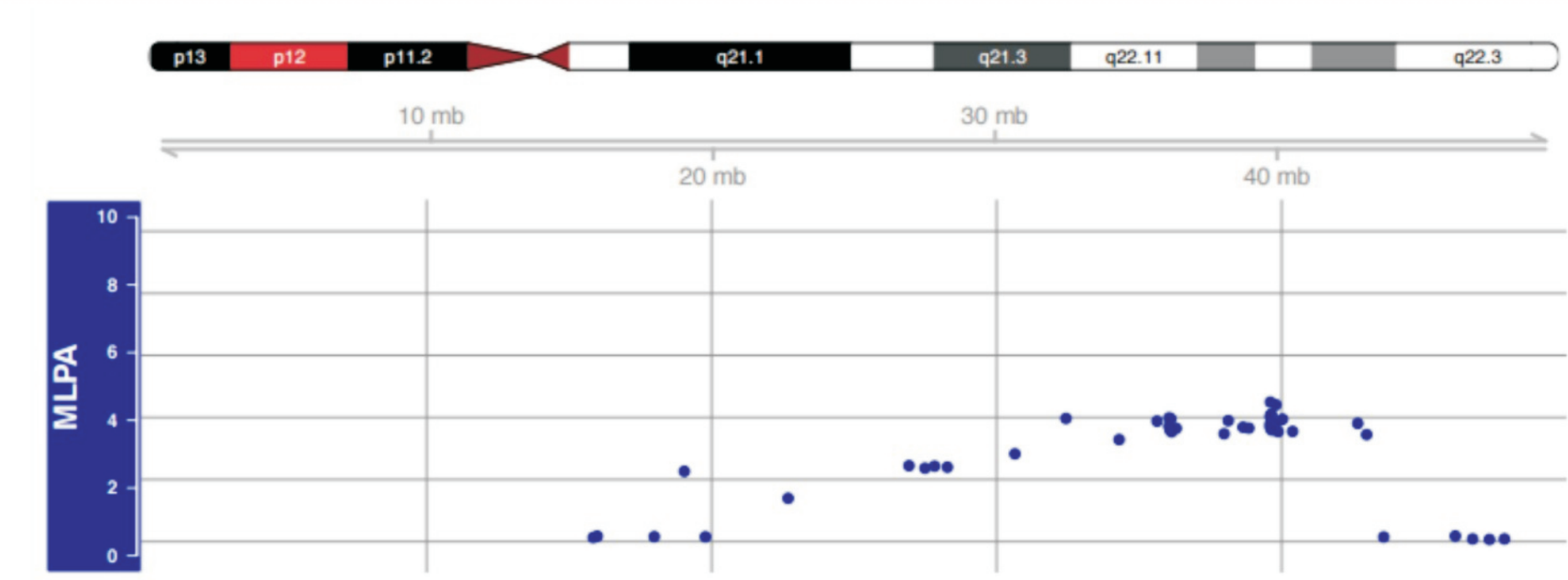


Figura 4: Gráfico gerado pela análise de MLPA representando o perfil de um caso iAMP21 com um seguimento do cromossomo normal, uma região com alto nível de amplificação envolvendo o gene *RUNX1* (peak ratio maior que 2,13) e deleção na região telomérica.

Tabela 1: Características clínico-demográficas dos casos LLA-cpB, Brasil, 2002-2016

Características	MLPA positivo n (%)	MLPA negativo n (%)
Total	82 (23)	291 (79)
Gênero		
Masculino	45 (55)	164 (56)
Feminino	37 (45)	127 (44)
Faixa etária, (anos)		
-	4 (5)	34 (12)
2-10	66 (80)	177 (61)
>10	12 (15)	80 (27)
Cor da pele		
Branco	42 (51)	117 (43)
Não branco	39 (49)	157 (57)
Leucometria, x10 <sup>9</sup> /l		
<20	43 (54)	142 (50)
20-50	16 (20)	56 (20)
>50	21 (26)	88 (31)
Imunofenótipo		
LLA pró-B	0 (0)	29 (10)
LLA-comum	74 (90)	226 (78)
LLA pré-B	8 (10)	36 (12)
Grupo de risco (NCI)		
Risco padrão	47 (57)	139 (48)
Alto risco	35 (43)	152 (52)
Status		
Vivo	26 (79)	28 (65)
Óbito	7 (21)	15 (35)

Abreviações: n, número.

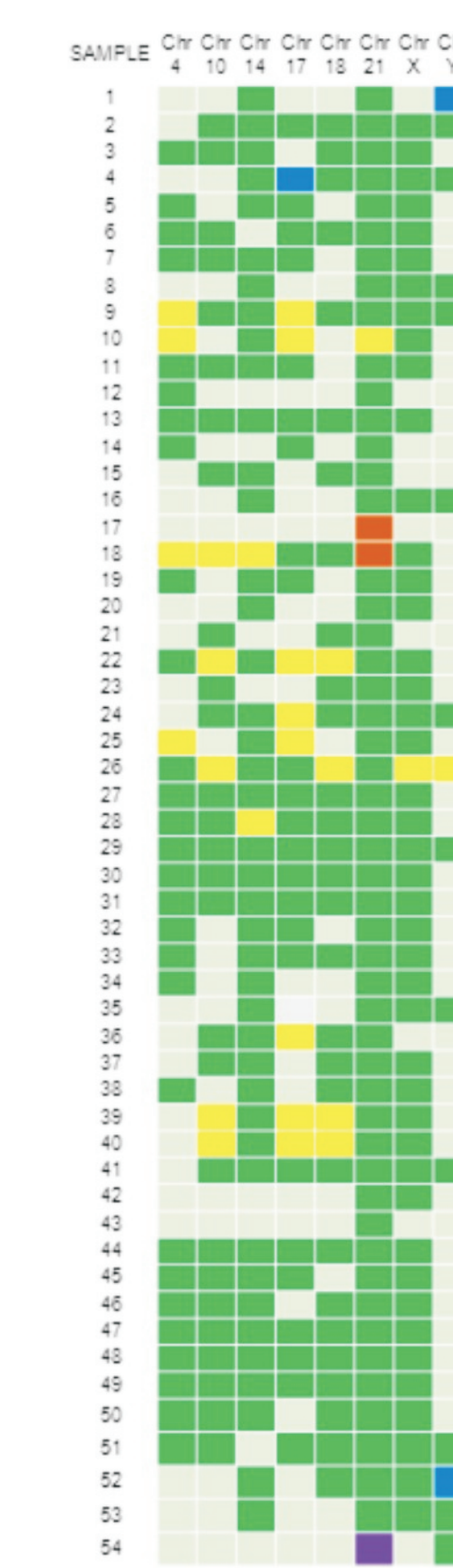


Figura 6: Heat map das alterações numéricas detectadas por FISH na coorte de LLA, Brasil, 2002-2016.

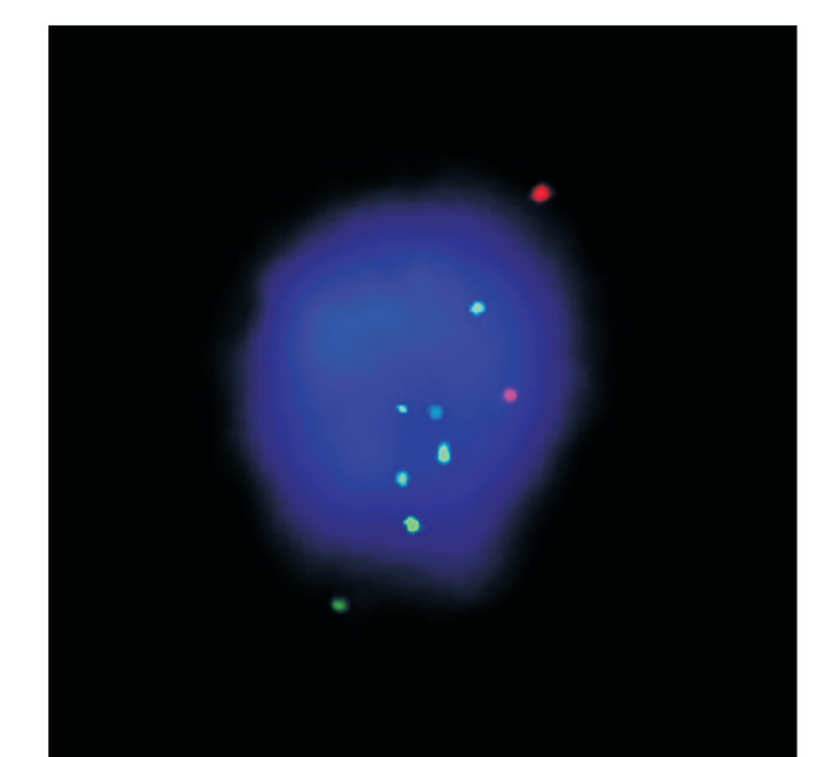


Figura 5: FISH interfásico detectando *ETV6* (vermelho) e *RUNX1* (verde) em um caso iAMP21. A célula apresenta dois sinais para *ETV6* (normal) e 6 sinais para *RUNX1*, o que caracteriza um caso iAMP21.

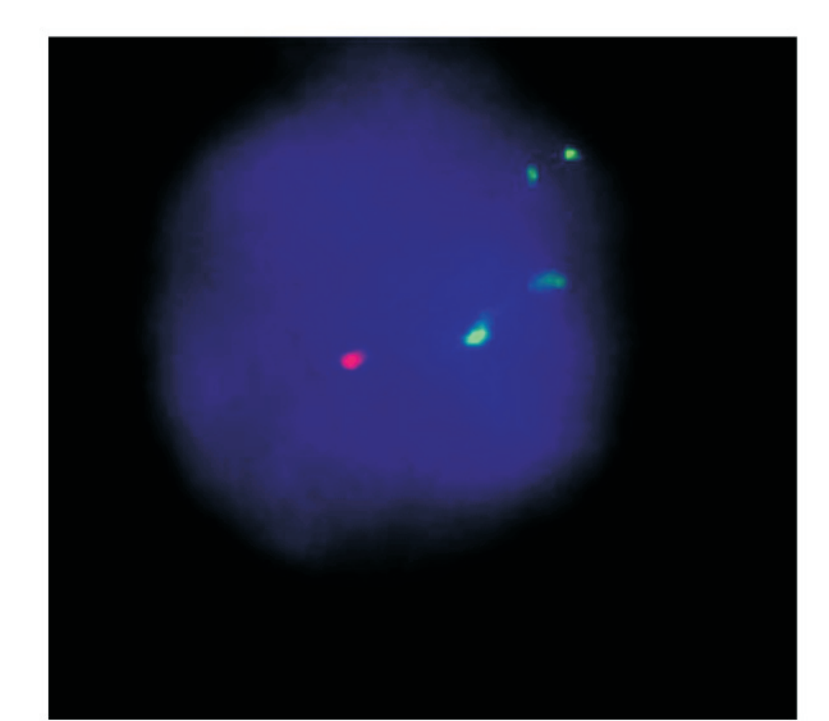


Figura 7: FISH interfásico com sondas centroméricas direcionadas para os cromossomos 13/21 (verde) e telomérica para o 21q (vermelho) em um caso iAMP21.

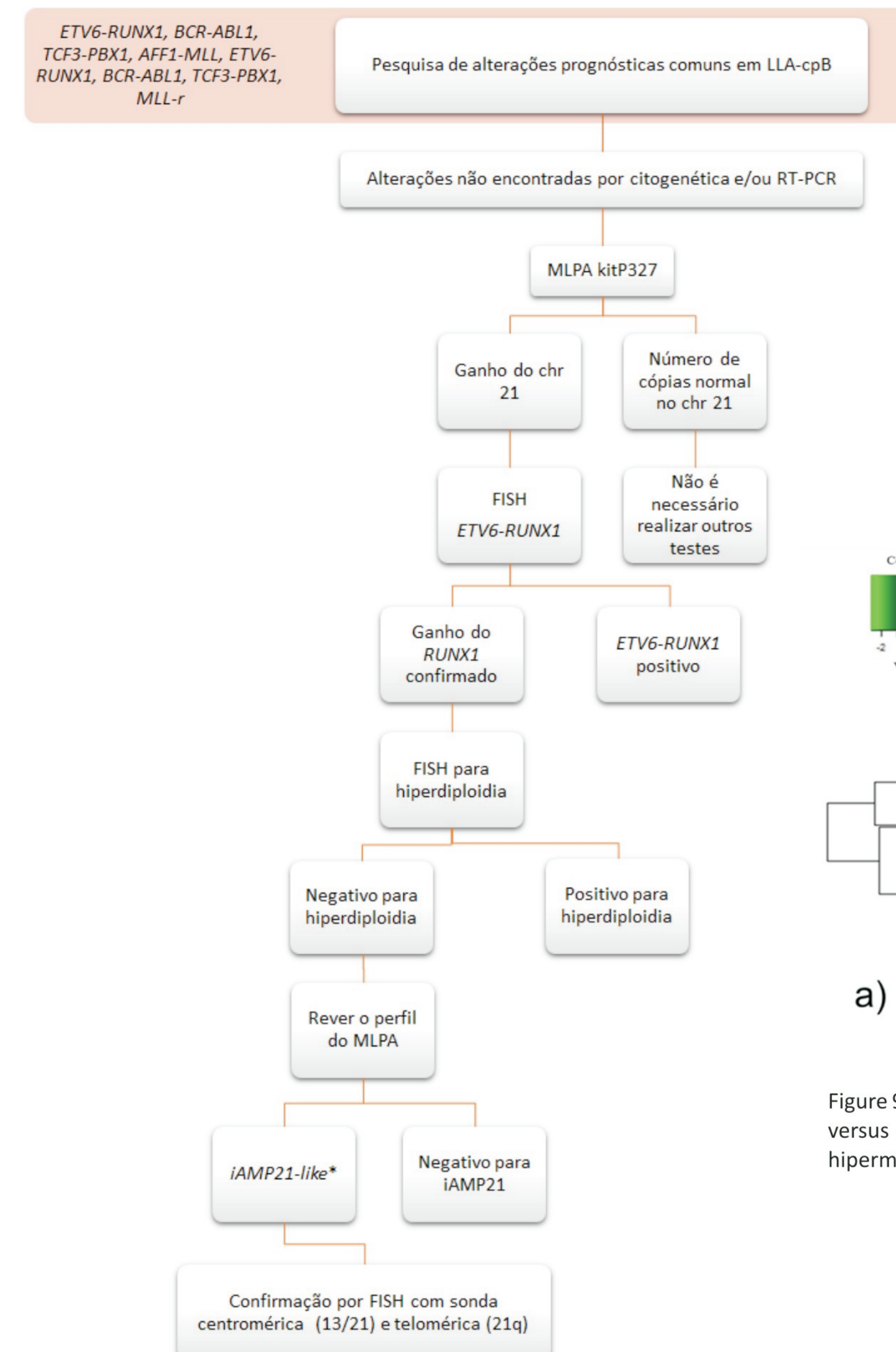


Figura 8: Fluxograma proposto para identificar os casos iAMP21 na prática diagnóstica.

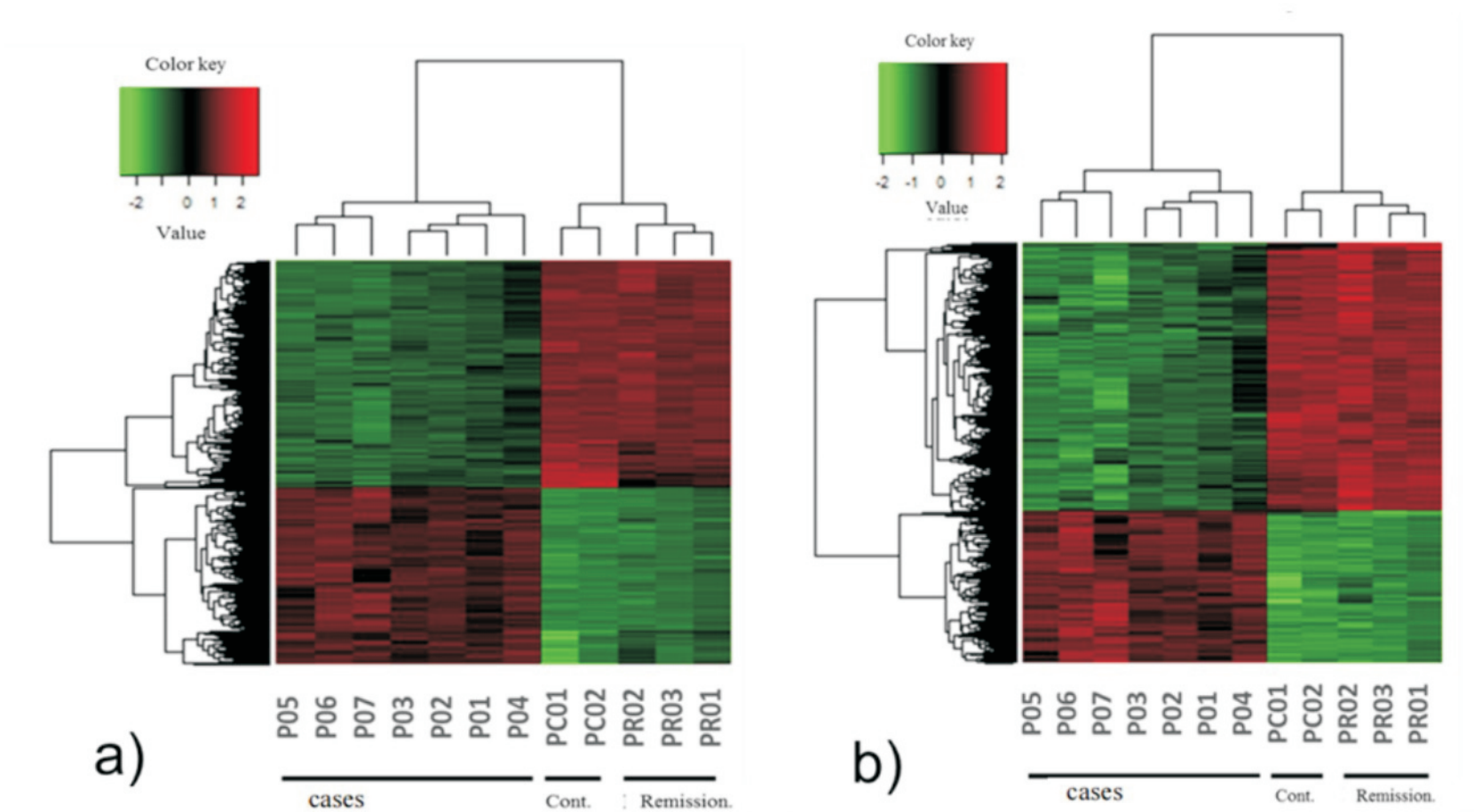


Figura 9: Agrupamento hierárquico dos casos, controles e amostras de remissão. A. Análise casos versus controles com 5031 DMR. B. Análises casos versus remissão com 6796 DMR. Regiões hipermetiladas estão representadas em vermelho e regiões hipometiladas em verde.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É recomendada a análise de FISH com sonda centroméricas/telomérica na identificação da iAMP21 em casos sem informação de cariótipo. Os casos de LLA-cpB apresentaram um perfil próprio de metilação. Nas etapas seguintes deste estudo pretendemos realizar análises comparativas quanto ao perfil de metilação nos diferentes subtipos de LLA-cpB.

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

Financiamento CNPq, FAPERJ, Oncobiologia

