

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**ALTERAÇÕES MOLECULARES CONSTITUTIVAS NA REGIÃO CROMOSSÔMICA
13q14 EM PACIENTES COM RETINOBLASTOMA**

VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA

RIO DE JANEIRO
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**ALTERAÇÕES MOLECULARES CONSTITUTIVAS NA REGIÃO
CROMOSSÔMICA 13q14 EM PACIENTES COM RETINOBLASTOMA**

VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA

Monografia apresentada ao curso de graduação Bacharelado em Biomedicina, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Hector Nicolas Seuanez Abreu

RIO DE JANEIRO 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**ALTERAÇÕES MOLECULARES CONSTITUTIVAS NA REGIÃO
CROMOSSÔMICA 13q14 EM PACIENTES COM RETINOBLASTOMA**

VANESSA DOS SANTOS MENDONÇA SILVA

Monografia apresentada ao curso de graduação Bacharelado em Biomedicina, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Hector Nicolas Seuanez Abreu

Aprovada em: ____/____/____. Nota: _____

Dr. Hector Nicolas Seuanez Abreu - Orientador

Instituto Nacional de Câncer - INCA

Dr^a Ana Teresa Nogueira Dumans – Orientadora Acadêmica

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira Instituto

Nacional de Câncer - INCA

Msc. Renan Gabriel Gomes Júnior – PPGO Instituto

Nacional de Câncer - INCA

Dedico este trabalho ao meu tio Itamar (*in memoriam*) que tanto se orgulhou desta minha caminhada, mas não pôde presenciar esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado e me permitiu concluir esta importante etapa.

À minha mãe e a minha avó que, com muita luta, me permitiram cursar a graduação sem que me faltasse nada que fosse necessário, principalmente amor, mesmo diante do meu constante estado de estresse.

Ao meu pai e à minha família por estarem do meu lado, por se orgulharem e por dividirem comigo cada tristeza e cada alegria que essa jornada me proporcionou.

Aos pacientes e aos seus familiares, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Hector por ir muito além do seu papel de orientador, por me acolher, estando sempre disposto a me ensinar, me ajudar, por ser compreensivo e por participar de momentos importantes na minha vida. Obrigada por se tornar um grande exemplo pra mim e por me guiar no início dessa longa caminhada pela carreira acadêmica.

Ao Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira e ao Msc. Renan Gabriel Gomes Júnior por aceitarem o convite para compor a banca.

À Dra. Ana Teresa Dumans por aceitar ser minha orientadora acadêmica e pela paciência diante dos meus prazos sempre enrolados.

Ao Dr. Fernando Vargas por ter me dado a oportunidade de ingressar no laboratório.

À Karla Moura que me ensinou a dar os primeiros passos e a amar aquilo que faço.

À Adriana Reis por sua orientação que foi essencial para que eu aprendesse a persistir.

À Dra. Anna Claudia por participar ativamente do desenvolvimento deste trabalho, estando sempre pronta a ajudar.

Ao Regis Costa e Raissa Coelho que não exitaram em me ensinar da melhor forma possível cada passo da principal metodologia utilizada.

À Lucia pela sua disponibilidade em me auxiliar com a parte citogenética.

À Marcelle por me mostrar que trabalhar em dupla pode ser maravilhoso, por continuar sendo minha dupla mesmo fora do laboratório, por compartilhar das minhas manias e me entender (uma tarefa nada fácil). À Barbara Diniz por ter aceitado se aventurar neste grupo, mostrando que um trio pode tornar tudo ainda melhor.

À Arina, Camila, Cíntia, Júlia, Francine, Larissa, Romul e Kariny por tornarem os meus dias mais divertidos e por tornarem a copa um lugar de risos, brincadeiras, choro, compreensão e acolhimento.

A todos os alunos do Laboratório do Programa de Genética e à Andressa por estarem dispostos a responder minhas tantas perguntas e por dividirem comigo todos momentos imprevisíveis e incríveis que o laboratório e os experimentos podem trazer.

À Alice, Carole, Jessica, Isabella, Mayra, Lucas, Luisa e Rayssa por todo apoio que me deram na maior parte desta trajetória e por tornarem mais simples as tantas complicações de uma graduação.

À Camila, Cristiane e Janice e novamente à Mayra e ao Lucas por me acolherem e por estarem ao meu lado também nesta nova fase que se inicia.

A todos os meus amigos que estavam fora do ambiente da faculdade e do laboratório, mas que participaram desta caminhada ao entender a minha constante ausência e meus momentos de estresse (que também eram quase constantes) e por, mesmo assim, não desistirem de mim.

RESUMO

O retinoblastoma é um tumor ocular maligno que se apresenta, geralmente, no primeiro ou segundo ano de vida, sendo este o tumor intraocular mais comum na infância. O tumor pode se manifestar uni ou bilateralmente, apresentando um ou múltiplos focos e sua ocorrência pode ser na forma esporádica ou hereditária. Alterações no gene *RBI* são os principais fatores que causam a doença sendo necessário que ambos os alelos deste gene deixem de ser funcionais nos retinoblastos para que haja desenvolvimento do tumor. A criança portadora de uma alteração constitucional no gene *RBI* tem maiores chances de desenvolver o retinoblastoma, além outras neoplasias não oculares como osteossarcomas e sarcomas de partes moles. Grande parte das alterações constitutivas encontradas no gene *RBI* consiste em substituições de um ou poucos nucleotídeos, porém, em alguns casos, é possível encontrar grandes deleções ou duplicações neste gene e/ou na região cromossômica 13q14. Estes grandes rearranjos podem não ser detectados pelo sequenciamento, principal metodologia utilizada na detecção de mutações patogênicas, mas podem ser detectados através da MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Este trabalho utilizou a metodologia de MLPA em amostras de DNA de sangue periférico de pacientes com retinoblastoma atendidos no Programa de Aconselhamento Genético do INCA, que não apresentaram mutações patogênicas em *RBI* através do sequenciamento direto. A reação de MLPA foi realizada em amostras de 46 pacientes e foi obtido resultado em 30 deles. Em cinco casos foram encontradas algum tipo de alteração, sendo três provenientes de pacientes com tumor bilateral e dois com tumor unilateral. As alterações encontradas caracterizam-se por deleção em heterozigose, deleção do exon 23 e amplificação da região compreendida entre os exons 12 e 17, todas relacionadas ao gene *RBI*. Dois resultados foram confirmados através de cariotipagem ou FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*).

Palavras – chave: gene *RBI*, MLPA, deleção, número de cópias.

ABSTRACT

The retinoblastoma is a ocular malignant tumor that generally occurs in the first or second year of life. It is a common intraocular tumor presents in childhood and can be uni or bilateral, presenting one or multiple focus on sporadic or heredity form. Alterations in *RB1* gene are the main causes of the disease and for the tumor development is necessity that both of gene alleles stop being functional on retinoblasts. The carrier child with a constitutional alteration in *RB1* gene have a greater chance to development the retinoblastoma, beyond others not ocular neoplasias like osteosarcomas and sarcomas. The great part of the constitutive alterations in *RB1* gene are substitutions of the one or a little nucleotides, however, in some cases, it is possible sees large deletions or duplications on gene or on chromosomal region 13q14. These rearrangements can not be detected for sequencing that is the main methodology used in detection of pathogenic mutations, however, the rearrangements can be detected through MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). This work used DNA samples of peripheral blood of patients with retinoblastoma from Genetic Counseling Program from INCA using the MLPA methodology. These patients did not show pathogenic mutations on *RB1* through direct sequencing, then, the MLPA reaction was carried out in 46 patients and was obtained 31 results of them, in five cases were found some alteration, being three of them coming from patients with bilateral tumor and two with unilateral tumor. The alterations found are characterized by deletion in heterozygous, deletion of exon 23 and amplification of the region between exon 12 and 17, all alterations are related with *RB1* gene. Two results were confirmed through karyotype or FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*).

Keywords: *RB1* gene, MLPA, deletion, copy number.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Aspectos epidemiológicos do retinoblastoma	10
1.2	O gene <i>RBI</i> e a pRB	10
1.3	Aspectos clínicos do retinoblastoma	12
1.4	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Principal	15
2.2	Objetivos Secundários.....	15
3	METODOLOGIA	15
3.1	MLPA	16
3.1.1	Desnaturação	16
3.1.2	Hibridização	17
3.1.3	Ligação	17
3.1.4	PCR	17
3.1.5	Eletrforese capilar e análise dos resultados	18
3.2	Análise citogenética	18
3.2.1	Cultura de células	19
3.2.1	Preparação das lâminas	19
3.2.2	Bandamento G e cariotipagem	20
3.2.3	Hibridização in situ por fluorescência (FISH)	20
3.2.4.1	Primeiro dia – Hibridização da Sonda	20
3.2.4.2	Segundo dia – Lavagens pós-hibridização	21
4	RESULTADOS	22
5	DISCUSSÃO	27
5.1	Paciente P28	28
5.2	Paciente P12	29
5.3	Paciente P53	30
5.4	Paciente P49	31
5.5	Paciente P48	32
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do retinoblastoma

O retinoblastoma (RB. OMIM 180200) é o tumor ocular maligno mais comum na infância, compreendendo cerca de 4% de todas as neoplasias pediátricas (ABRAMSON, 2005). A incidência global do retinoblastoma é de um em 16.000-18.000 nascidos vivos por ano (BARTUMA et al., 2014), não sendo descritas evidências válidas de variações geográficas ou raciais na incidência desta neoplasia (KRISHNA; YU; FINGER, 2009; MORENO et al., 2014). No Brasil, a incidência do retinoblastoma em crianças de zero a quatro anos, varia de 14.6 por milhão (em Salvador) a 27 por milhão, em Natal (DE CAMARGO, 2010). Apesar da faixa etária mais frequente dos acometidos pelo retinoblastoma ser compreendida entre zero e cinco anos, alguns casos em adultos jovens já foram relatados (SINGH et al., 2011).

1.2 O gene *RBI* e a pRB

Geralmente o tumor é desencadeado pela perda de função dos dois alelos do gene *RBI* (*Retinoblastoma 1*) nos retinoblastos, células imaturas da retina. Como proposto por Knudson (1971), por se tratar de um gene supressor tumoral, é necessário que ocorra, inicialmente, a inativação de ambos os alelos do gene *RBI* em uma mesma célula para que haja desenvolvimento do tumor. Na forma esporádica, o tumor é causado por duas mutações somáticas nos retinoblastos. Na forma hereditária, o primeiro evento mutacional é herdado de um dos progenitores resultando em uma mutação constitucional. Uma mutação constitucional pode também ser observada nos casos congênitos, onde o primeiro evento mutacional ocorre na pós-concepção. Nos dois casos o evento mutacional é sempre somático e ocorre nos retinoblastos, determinando o desenvolvimento da neoplasia.

O gene *RBI* é constituído por 27 exons que variam entre 31 a 1899 pares de base (pb) e que codificam, através de um transcrito de 4.7 quilobases (kb), uma fosfoproteína nuclear composta por 928 resíduos de aminoácidos, a proteína do retinoblastoma (pRB). Grande parte do gene, totalizando cerca de 60kb, é composto de íntrons (regiões não

transcritas), sendo o menor deles de 80pb (TOGUCHIDA et al., 1993). A proteína codificada pelo gene *RBI*, tem propriedades regulatórias sobre o ciclo celular e é modulada durante a proliferação e diferenciação da célula por fosforilação e desfosforilação. Basicamente, quando fosforilada, a pRB apresenta-se em sua forma inativa e, quando não fosforilada, em sua forma ativa (BUCHKOVICH et al., 1989; CHEN et al., 1989; DECAPRIO et al., 1989). A pRB apresenta-se hipofosforilada em células em repouso (G0), é progressivamente fosforilada através da fase G1 e, posteriormente, mantida em estado hiperfosforilado durante toda a mitose (GIACINTI; GIORDANO, 2006).

A regulação do ciclo celular através da pRB é feita através da elaboração de um complexo formado por esta proteína, a família de fatores de transcrição *E2F* (*Elongation Factor 2*) e o fator de transcrição *DPI*. A junção *E2F-DP* permite a ligação destes aos promotores de genes necessários para a síntese do DNA e a atração de enzimas denominadas histonas acetilases, que remodelam a cromatina tornando-a favorável à transcrição. Quando a pRB está hipofosforilada (ativa) é capaz de se ligar ao conjunto *E2F-DP* e bloquear fisicamente o domínio de transativação de *E2F*, necessário para ativação da transcrição gênica e, ao mesmo tempo, é capaz de atrair histonas deacetilases que tornam a configuração da cromatina incompatível com a transcrição. Em um cenário normal de proliferação celular, ocorre a regulação deste mecanismo através de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, que são responsáveis pela fosforilação da pRB, levando a sua separação da família *E2F-DP* e, conseqüentemente, permitindo que a célula prossiga com o ciclo, entrando na fase de síntese (S) do DNA (HARBOUR; DEAN, 2000; LUO; POSTIGO; DEAN, 1998; WEINBERG, 1995; ZHANG; POSTIGO; DEAN, 1999).

A disfunção de *RBI*, que pode ocorrer através de eventos epigenéticos e mutacionais, resulta em uma constante proliferação celular. A maioria das mutações constitutivas encontradas no gene *RBI* consiste em substituições de um ou poucos nucleotídeos (LOHMANN et al., 1996). Porém em cerca de 10% dos casos de retinoblastoma bilateral é possível observar pequenas deleções na região cromossômica *13q14*, deleções submicroscópicas ou rearranjos, que ocorrem em cerca de 8% dos casos bilaterais e entre 1-4,9% dos casos de retinoblastoma unilateral esporádico e variações no número de cópias do gene *RBI*. (HARBOUR, 1998; LOHMANN, 1999).

Apesar da perda da atividade normal do gene *RBI* gerar instabilidade genômica, permitindo a iniciação e a promoção tumoral, primariamente essa instabilidade leva ao desenvolvimento do retinoma benigno, que progride para o retinoblastoma à medida que alterações genômicas adicionais contribuem para a proliferação celular descontrolada (DI

FIGLIORE et al., 2013; DIMARAS et al., 2008). Entre estes eventos adicionais que levam a progressão do retinoma para retinoblastoma já foram descritos ganhos na região 1q32 envolvendo os genes *KIF14* (*Kinesin Family Member 14*) e *MDM4* (*Mouse Double Minute 4 Homolog*), na região 2p24 envolvendo o gene *MYCN* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog*), 7q22 e 12q31; perdas na região 16q22 envolvendo o gene *CDH11* (*Cadherin 11*) e 16q22.2 envolvendo o gene *RBL2* (*Retinoblastoma-like 2*), além de mutações no gene *BCOR* (*BCL6 Corepressor*) e ativação epigenética do gene *SYK* (*Spleen Associated Tyrosine Kinase*) (DIMARAS et al., 2015). Ainda que haja predomínio das alterações no *RBI* como desencadeador do retinoblastoma, em cerca de 1,4% dos casos não há evidência de variações nesse gene, mas há níveis aumentados do oncogene *MYCN* que também gera desenvolvimento do tumor. (RUSHLOW et al., 2013).

1.3 Aspectos clínicos do retinoblastoma

No retinoblastoma as manifestações fenotípicas mais frequentes são a leucocoria (presente em 60% dos casos), que corresponde a um reflexo pupilar branco, e o estrabismo (presente em 20% dos casos) (BALMER; ZOGRAFOS; MUNIER, 2006). O tumor, geralmente, manifesta-se unilateralmente (em um dos olhos) ou bilateralmente (nos dois olhos), apresentando um ou múltiplos focos. Porém em alguns casos há co-ocorrência de pinealoblastoma ou tumor neuroectodérmico primitivo sendo denominados como retinoblastoma trilateral.

Em retinoblastoma a caracterização de alterações genéticas constitucionais é de grande importância, pois podem indicar uma maior chance de desenvolvimento de outras doenças, como retardo mental e/ou deficiência motora (JONES, 1998). Nos casos hereditários, a criança que é portadora de uma mutação constitutiva no gene *RBI*, tem 90% de chance de desenvolver tumor uni ou bilateral, além do risco de desenvolver outras neoplasias não oculares como osteossarcomas e sarcomas de partes moles (DICOMMO; GALLIE; BREMNER, 2000). A identificação do primeiro evento mutacional no gene *RBI* possibilita o estabelecimento de estratégias de prevenção através do aconselhamento genético das famílias portadoras, sendo essencial para elucidar o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores, que é para estes indivíduos superior ao da população.

1.4 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

A técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) tem como objetivo a detecção do número de cópias de até 50 regiões diferentes de DNA ou RNA genômico em uma única reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Outras metodologias também são capazes de detectar mudanças no número de cópias, como CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) (KALLIONIEMI et al., 1992), FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) (KLINGER et al., 1992), Southern blots e ensaios de perda de heterozigose (LOH) (DEVILEE; CLETON-JANSEN; CORNELISSE, 2001). Porém a MLPA apresenta vantagens sobre elas por ser facilmente aplicável e por se basear em ensaios *multiplex* (uma única reação que produz vários resultados) em contraste com as técnicas de FISH e LOH; por ser realizada com pequenas quantidades de amostra, diferentemente, por exemplo, dos Southern blots, e por detectar duplicações e deleções do gene completo mesmo quando há presença de um alelo normal, o que não é observado pelo sequenciamento direto. Apesar das vantagens citadas, a sensibilidade para detecção de casos de mosaicismos de baixo grau (<10%) é inferior à sensibilidade apresentada por outras técnicas, como FISH (VAN VEGHEL-PLANDSOEN, 2011).

A MLPA detecta o número de cópias de sequências alvo (por exemplo, exons dentro de um gene) através da amplificação de várias sondas, cada uma delas formada pela união de dois oligonucleotídeos que hibridizam em regiões adjacentes em cada região alvo, e que podem ser amplificadas com um único par de iniciadores universais, um deles marcado com fluorescência. Os dois oligonucleotídeos que compõem cada sonda diferem no tamanho e na constituição. O primeiro é um oligonucleotídeo com uma sequência complementar à região alvo na terminação 3' e, na terminação 5', uma sequência de 19 nucleotídeos idêntica ao iniciador marcado com fluorescência. A segunda parte da sonda possui a seguinte estrutura: um fragmento de 25 a 43 nucleotídeos correspondente a região alvo em sua terminação 5', um inserto de uma sequência não humana de tamanho variável, e 36 nucleotídeos correspondentes ao iniciador não marcado em sua terminação 3'. Cada sonda hibridizará a uma região determinada dentro de um gene, podendo analisar até 50 regiões alvo em uma mesma reação *multiplex*. Os dois oligonucleotídeos, quando hibridizados, podem ser ligados, pois os fragmentos específicos para região alvo são imediatamente adjacentes, com espaço de apenas um nucleotídeo. Quando a ligação ocorre, forma-se uma sequência contínua, com sítios de anelamento para o par de iniciadores, que pode ser amplificada através de PCR. O tamanho variável do inserto de

cada sonda permitirá amplificar fragmentos de diferentes tamanhos que poderão ser identificados na eletroforese capilar (SCHOUTEN et al., 2002).

Antes da etapa de hibridização, é necessário que a amostra de DNA seja exposta a um período de desnaturação para que se apresente como fita única, possibilitando a hibridização das sondas. A Figura 1 mostra a estrutura geral das sondas e as etapas da MLPA que ocorrem após a desnaturação do DNA. A reação de MLPA pode ser realizada com concentrações de DNA entre 20-500 ng sem alterações na eficiência ou nos resultados. Em contrapartida, quando utilizadas concentrações inferiores a 20 ng há aparecimento de produtos inespecíficos após a amplificação. (SCHOUTEN et al., 2002).

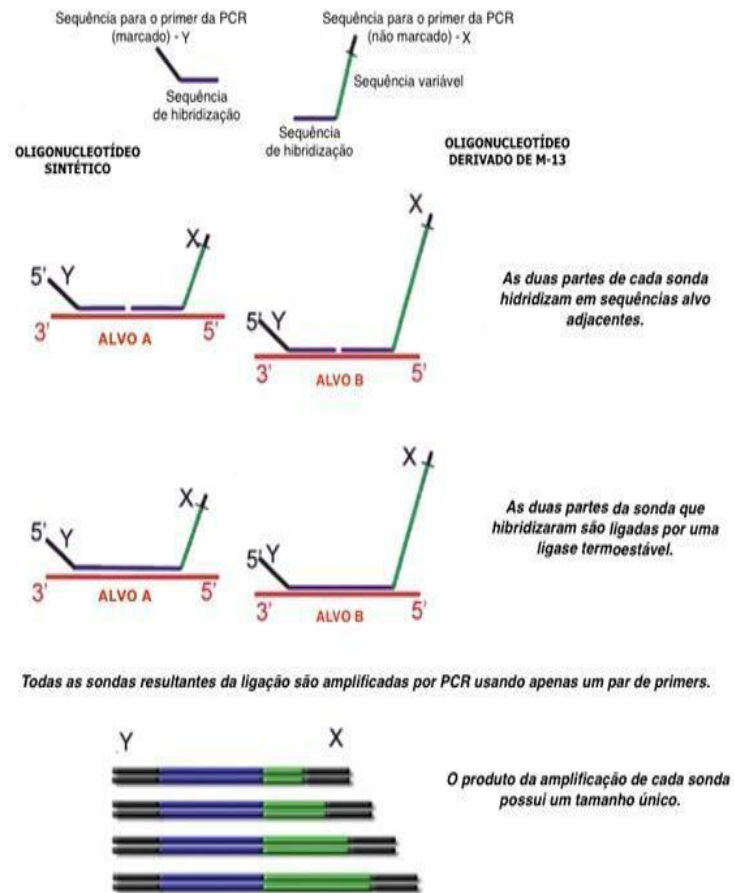


Figura 1. Estrutura da sonda para MLPA formada por 2 oligonucleotídeos. Em preto: regiões de anelamento de iniciadores (X e Y), em azul: sequencias complementares às regiões alvo, em verde: inserto. O tamanho do inserto é diferente para cada sonda que resultará em produtos amplificados de diferente tamanho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Identificar por meio de MLPA alterações constitutivas no gene *RBI* não detectadas pela metodologia de sequenciamento direto em amostras de DNA de pacientes com retinoblastoma.

2.2 Objetivos Secundários

Confirmar, quando possível, as alterações encontradas por MLPA através técnicas de citogenética, tais como FISH e cariotipagem.

Contribuir com os dados para o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares.

3 METODOLOGIA

Este estudo foi inserido no projeto "Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma" (protocolo 40/00), aprovado desde 2001 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer (INCA). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os participantes. A cópia da carta de aprovação pelo CEP está contida no Anexo I.

A amostra de estudo foi constituída por pacientes com retinoblastoma diagnosticados entre zero e 54 meses de idade, que deram entrada no Instituto Nacional de Câncer (INCA) no período entre junho de 1998 e abril de 2014, cuja análise prévia dos 27 éxons do gene *RBI*, através do sequenciamento direto não mostrou alterações patogênicas. Do total de 46 pacientes (27 do sexo feminino e 19 do sexo masculino), 13 possuíam tumor bilateral, 32 tumor unilateral e um unilateral multifocal.

O DNA utilizado foi previamente extraído de amostras de sangue periférico, pelo método de extração salina (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988) e disponibilizados pelo Programa de Aconselhamento Genético do INCA. Amostras de DNA de voluntários saudáveis, também extraídas pelo método de extração salina (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), foram utilizadas para controle das reações de MLPA.

3.1 MLPA

A MLPA foi realizada com o conjunto de reagentes "SALSA MLPA KIT PO47 RB1 versão D1" (MRCHolland, Holanda), seguindo as instruções do fabricante, com modificação no tempo inicial de desnaturação das amostras, passado de cinco para dez minutos.

3.1.1 Desnaturação

As amostras de DNA foram inicialmente quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) e tiveram sua concentração ajustada para 20ng/ml através de diluição em água ultrapura. Transferiu-se 5µL destas diluições para tubos de 0,2ml devidamente identificados, que foram levados ao termociclador, onde permaneceram a 98°C por 10 minutos e imediatamente resfriados a 25°C.

3.1.2 Hibridização

Os reagentes SALSA MLPA buffer (tampão) e SALSA probemix (sondas) foram ressuspensos em um vórtex e misturados em uma proporção de 1,5 μL de cada reagente por amostra de DNA. Alíquotas de 3 μL desta mistura foram adicionadas a cada tubo contendo o DNA desnaturado, mantido no termociclador, homogeneizando lentamente as soluções com pipeta. Os tubos foram aquecidos a 98°C por 1 minuto e incubadas a 60°C por 18 horas.

3.1.3 Ligação

Os tampões necessários para esta etapa, *Ligase-65 Buffer A* e *Ligase-65 Buffer B* foram homogeneizados no vórtex. Em seguida, preparou-se uma mistura contendo 3 μL de cada um deles, 25 μL de água ultrapura e 1 μL da *Ligase-65* para cada tubo. Trinta e dois microlitros dessa mistura foram adicionados a cada tubo mantido no termociclador a 54°C. Os tubos foram incubados a 54°C por mais 15 minutos e posteriormente a 98°C por 5 minutos para inativar a *Ligase-65*. Por fim, as amostras foram conservadas no termociclador a 20°C até a próxima etapa.

3.1.4 PCR

A mistura foi preparada contendo, para cada tubo, 7,5 μL de água ultrapura, 0,5 μL da enzima SALSA *Polymerase* e 2 μL do SALSA PCR *Primer mix* (iniciadores). A mistura foi mantida no gelo até o momento da distribuição, colocando, em cada tubo, 10 μL desta mistura, homogeneizando lentamente as soluções com pipeta.

A PCR foi realizada em 35 ciclos de três etapas, sendo a desnaturação realizada a 95°C por 30 segundos, o anelamento dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 1 minuto. Ao fim dos 35 ciclos, as amostras foram submetidas a uma incubação de 20 minutos a 72°C e mantidas a 15° até serem retiradas do termociclador. Os produtos da PCR foram armazenados a -20°C em recipientes protegidos da luz até a montagem da placa para eletroforese capilar.

3.1.5 Eletroforese capilar e análise dos resultados

A eletroforese capilar foi realizada no analisador de DNA ABI -3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Para montagem da placa foi preparada uma mistura com 0,2µL do marcador GeneScan™ -500 LIZ® (Applied Biosystems, USA), um padrão de peso molecular projetado para dimensionar fragmentos de DNA na faixa de 35-50pb, e 9,0µL de formamida HiDi™ (referência ABI no 4311320) por tubo. A mistura foi homogeneizada e distribuída por cada poço da placa, onde foi acrescentado, posteriormente, 0,8µL de cada tubo da reação de MLPA. A placa foi submetida à eletroforese capilar com voltagem inicial de injeção de 1,6kV e tempo inicial de injeção de 15 segundos. A análise dos dados foi feita com o software GeneMarker (Soft Genetics, LLC; State College, PA, USA), considerando como deleções valores inferiores a 0,70 e como duplicações superiores a 1,30.

3.2 Análise citogenética

Para implementação das análises citogenéticas, os pacientes foram submetidos a uma nova coleta de sangue periférico em tubo contendo heparina.

3.2.1 Cultura de células

Em um tubo falcon de 15ml foram adicionados 6ml de meio de cultura RPMI-1640; 1,2ml de soro fetal bovino e 0,2ml de fitohemaglutinina, todos da marca Vitrocell®. Adicionou-se a este mesmo tubo Falcon 0,5ml de sangue total, coletado em tubo heparinizado, e homogeneizou-se a mistura por inversão. Com o tubo inclinado, a cultura foi mantida a 37°C durante 70h e, imediatamente após este tempo, adicionou-se 0,05ml de colchicina (0,8µg/ml) (Vitrocell®) e 100µl de Brometo de Etídeo (100mg/ml). O tubo foi incubado em estufa a 37°C por mais duas horas. Após as 72hs do implante da cultura de linfócitos, descartou-se o sobrenadante resultante de uma centrifugação a 1800 rotações por minutos (rpm) por 10min. Adicionou-se 6ml de Cloreto de Potássio (KCl - 0,075M), feita homogeneização por inversão e a amostra foi mantida a 37°C por 30min. Findado este tempo, centrifugou-se o material a 800rpm por 10min e o sobrenadante foi novamente descartado. Ao sedimento foi acrescentado 6ml de fixador, uma mistura de metanol e ácido acético em proporção de 3:1, e a amostra foi centrifugada a 800rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado. O procedimento de lavagem com fixador foi repetido duas vezes até o sobrenadante apresentar-se límpido. O material foi conservado a 4°C até a preparação das lâminas.

3.2.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram inicialmente higienizadas com detergente e água corrente, sendo conservadas em etanol 70% até o momento de uso. O material celular, obtido através da cultura de linfócitos, foi centrifugado a 800rpm por 10 minutos e o sobrenadante correspondente ao fixador acrescentado para armazenamento foi descartado, sendo substituído por fixador preparado no momento. O sedimento foi homogeneizado ao novo fixador com auxílio de uma pipeta Pasteur e, duas gotas dessa suspensão celular foram dispersas na lâmina, que foi anteriormente umedecida em água destilada para que ocorresse o espalhamento do material. Em microscópio invertido, foi avaliada a qualidade da lâmina preparada, sendo observado o número de metáfases, o espalhamento dos

cromossomos e a sobreposição destes. As lâminas de boa qualidade foram utilizadas para o bandamento G, montagem do cariótipo e FISH.

3.2.2 Bandamento G e cariotipagem

Para se obter um padrão de bandamento G, a lâmina, contendo material fixado de cromossomos, preparada no mesmo dia, foi tratada com uma solução contendo 100 mg de tripsina e 100ml de Dulbecco (136,87mM NaCl; 2,68mM KCl; 50,02mM KH₂PO₄; 5,37mM Na₂HPO₄) à temperatura ambiente por 3seg. Em seguida, foi lavada em tampão fosfato (136,87mM KH₂PO₄; 15,09mM NaOH, pH:6,8) à temperatura ambiente e, por fim, corada com solução de Giemsa (5% em tampão fosfato) por 5 minutos. Posteriormente foi lavada em água deionizada, seca ao ar e observada em um microscópio Zeiss®, com câmera Axio Cam MRC®. As imagens foram capturadas pelo sistema Axio Imager®.

3.2.3 Hibridização in situ por fluorescência (FISH)

Esta técnica foi utilizada para confirmar deleções a nível cromossômico utilizando sondas para a região 13q14 e outra específica para o gene *RBI*.

3.2.4.1 Primeiro dia – Hibridização da Sonda

Inicialmente foi preparada uma solução 2XSSC (Citrato de Sódio Salina) com 8,82g de Citrato de Sódio Diidratado, 17,53g de (NaCl) e água Milli-Q em quantidade suficiente para completar 900ml de solução. O pH foi ajustado para 7.0 e em seguida, completou-se o volume para 1000ml. Posteriormente, preparou-se 35ml de uma solução de 70% formamida/2XSSC em um frasco *coplin* que foi incubada em banho-maria a 73°C. As

lâminas cromossômicas foram colocadas nesta solução por 5 minutos e, em seguida, desidratadas em série crescente de álcoois a 4°C, por 3 minutos em etanol 70%, 3 minutos em etanol 80% e 3 minutos em etanol 100%. Feito isso, as lâminas secaram a temperatura ambiente. As sondas foram preparadas para aplicação nas lâminas de duas formas diferentes, de acordo com o fabricante. A sonda Vysis LSI 13 (*RBI*) 13q14 *SpectrumOrange Probe*, específica para o gene *RBI*, foi homogeneizada com o tampão de hibridização nas seguintes proporções: 1µl da sonda, 7µl do tampão de hibridização e 2µl de água Milli-Q, sendo aplicados na lâmina 5 µl desta mistura. A sonda Poseidon™ Repeat Free™ Chromosome 13 (13q14) Specific (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, the Netherlands) para a região 13q14, marcada em verde com PlatinumBright 495, foi diretamente aplicada à lâmina, no mesmo volume de 5µl. Após a aplicação, a região da lâmina contendo a sonda foi coberta com uma lamínula de 20mm² anteriormente higienizada com etanol 70% e selada com cola. A hibridação ocorreu no Hybrite (VYSIS®) a 37°C por 18 horas. Durante o tempo de manipulação da sonda e após sua aplicação, todos os procedimentos foram realizados na penumbra.

3.2.4.2 Segundo dia – Lavagens pós-hibridização

A solução 2XSSC, preparada no dia anterior teve seu pH novamente ajustado para 7.0 e, foram preparados, em frasco *coplin* as seguintes soluções: 3 soluções de 50% formamida/2XSSC e uma solução de 2XSSC/0,1% IGEPAL (Sigma, St.Louis, USA). As soluções foram incubadas em banho-maria a 37°C, assim como outro frasco *coplin* contendo apenas 2XSSC. Retirou-se a cola de todas as lâminas que foram então agitadas dentro da solução 50% formamida/2XSSC por 10 minutos até que as lamínulas se soltassem. Em seguida, as lâminas foram transferidas para um segundo frasco *coplin* contendo a mesma solução, onde permaneceram por mais 10 minutos, sendo esta etapa realizada mais uma vez. A próxima lavagem foi feita em 2XSSC, por 2 minutos e a última em solução 2XSSC/0,1% IGEPAL por 5 minutos. As lâminas secaram a temperatura ambiente e, a cada uma delas, foram acrescentados 10µl de corante DAPI (C₁₆H₁₅N₅). A região da lâmina contendo o DAPI foi coberta com uma lamínula de 20mm² anteriormente higienizada com etanol 70% e selada com cola para análise em microscópio de

fluorescência. A partir da aplicação do DAPI, as lâminas foram conservadas em posição horizontal e mantidas em caixas protegidas da luz a 4°C.

4 RESULTADOS

Do total de 46 pacientes, obteve-se resultado em 30 amostras. As reações que não funcionaram estão relacionadas a uma fragmentação do DNA após um longo período de armazenamento. Estes pacientes serão convidados para coleta do material para que a MLPA possa ser realizada em outro momento.

Em cinco casos foram encontradas algum tipo de alteração, sendo quatro provenientes de pacientes com tumor bilateral e dois de pacientes com tumor unilateral. Não foram encontradas alterações em 25 pacientes analisados. Alguns resultados puderam ser confirmados por outros métodos em vista da disponibilidade no laboratório dos reagentes e da aparelhagem necessários para a realização dos mesmos.

O paciente P28 apresentou, conforme evidenciado na Figura 2, deleção do exon 23 do gene *RBI*.

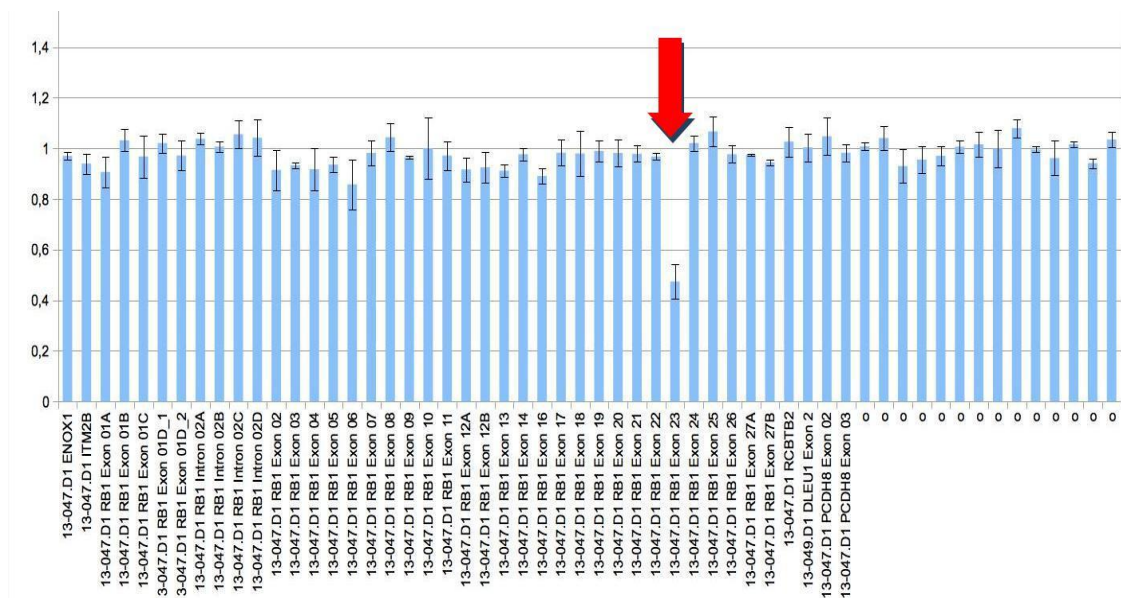


Figura 2. Resultado da MLPA para o paciente P28. A seta mostra deleção em heterozigose do exon 23 do gene *RBI*.

Na amostra do paciente P12 foi possível detectar deleção total de um alelo do gene *RBI* e parcial de outros genes localizados na região 13q14.2, como o *ITM2B*, *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1* (Figura 3).

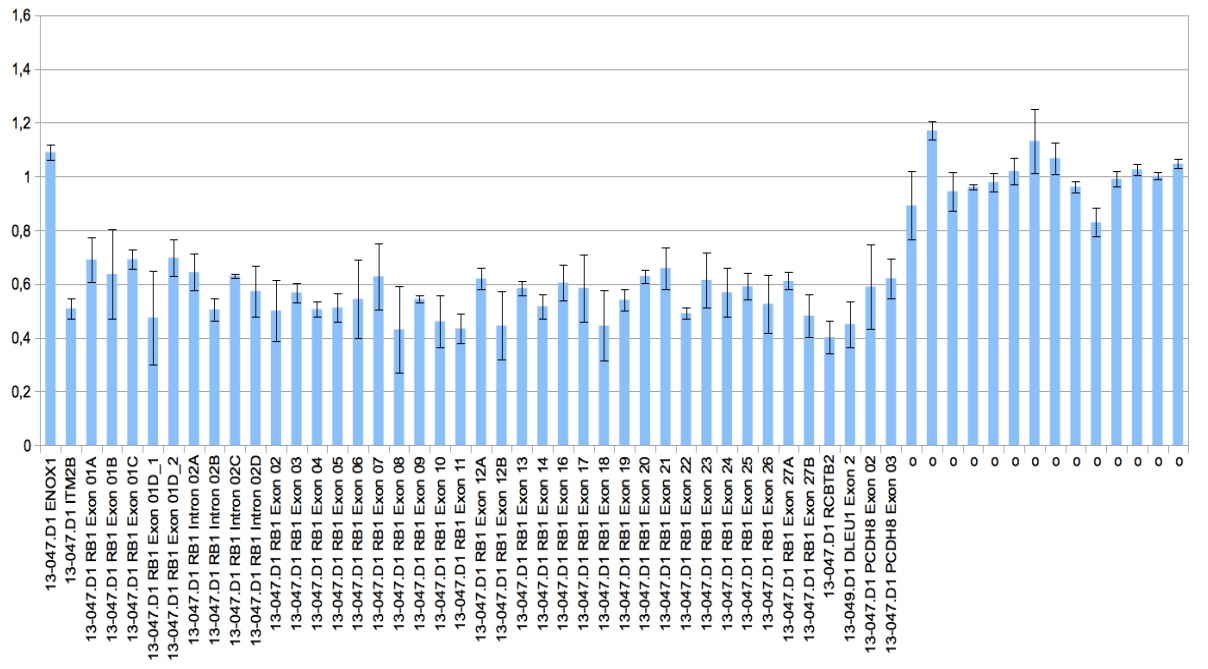


Figura 3. Resultado da MLPA para o paciente P12. Deleção completa de um alelo do gene *RBI*, abrangendo parte dos genes *ITM2B*, *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1*.

A amostra do paciente P12 teve a deleção apontada pelo MLPA confirmada através de cariotipagem com bandamento G (Figura 4).

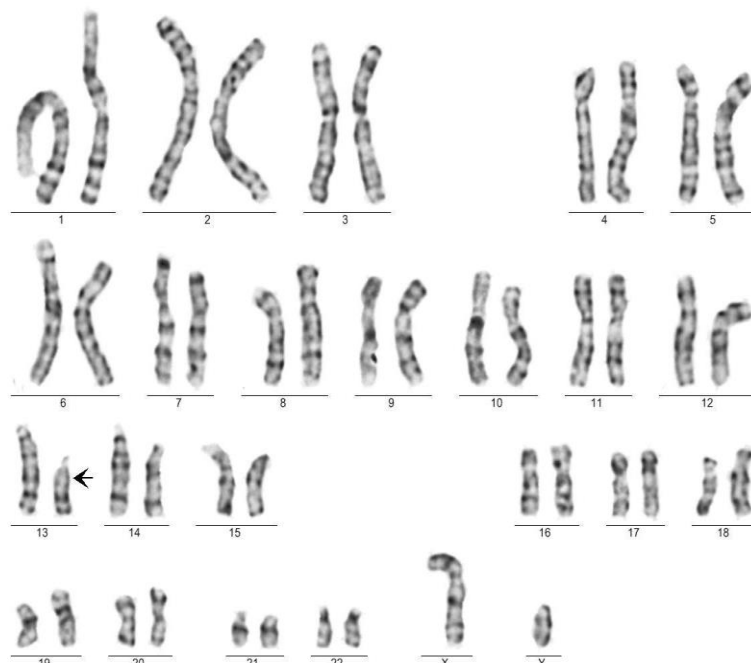


Figura 4. Cariótipo do paciente P12 evidenciando a deleção no cromossomo 13.

Em vista da disponibilidade da amostra de sangue periférico dos pais do paciente P12, a técnica de MLPA foi realizada para os mesmos em busca de alterações hereditárias, mas nenhuma anormalidade foi detectada (Figuras 5 e 6).

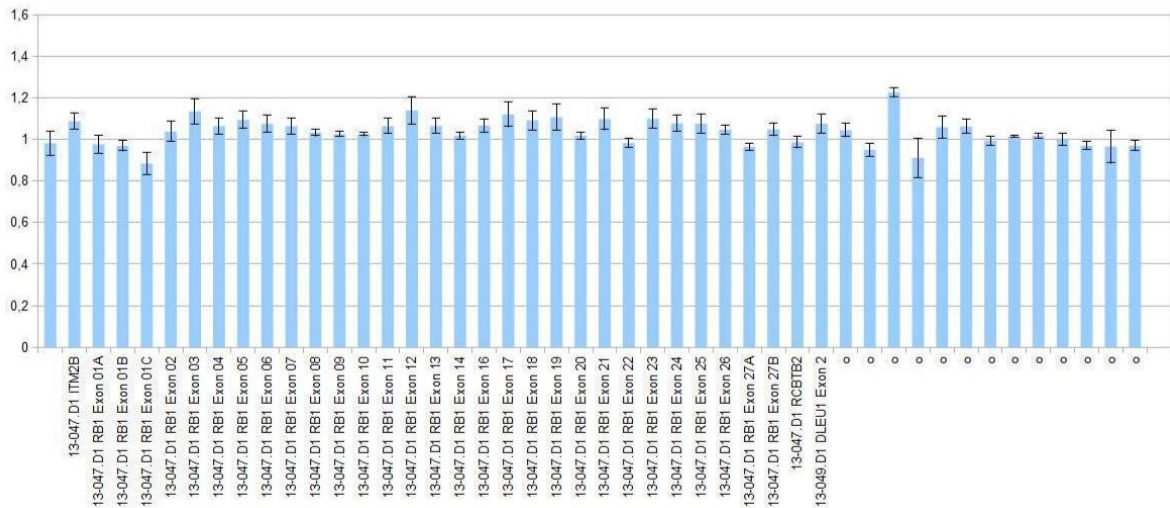


Figura 5. Resultado obtido na amostra da mãe do paciente P12 não apresentando alterações.

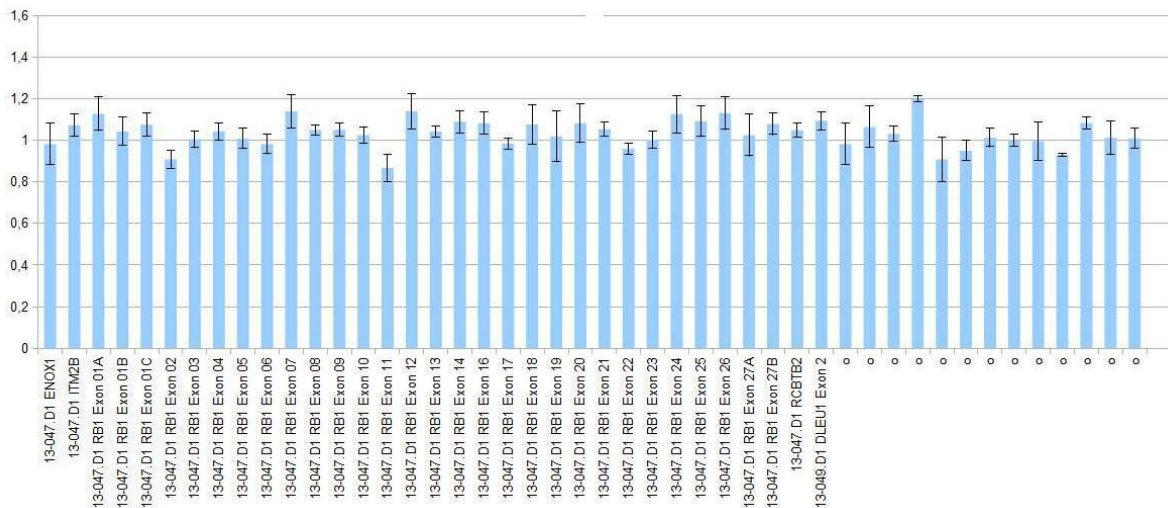


Figura 6. Resultado obtido na amostra do pai do paciente P12 não apresentando alterações.

Na amostra do paciente P53 foi encontrada deleção total do gene *RBI* e parcial dos genes *ITM2B* e *RCBTB2*, como mostrado na Figura 7.

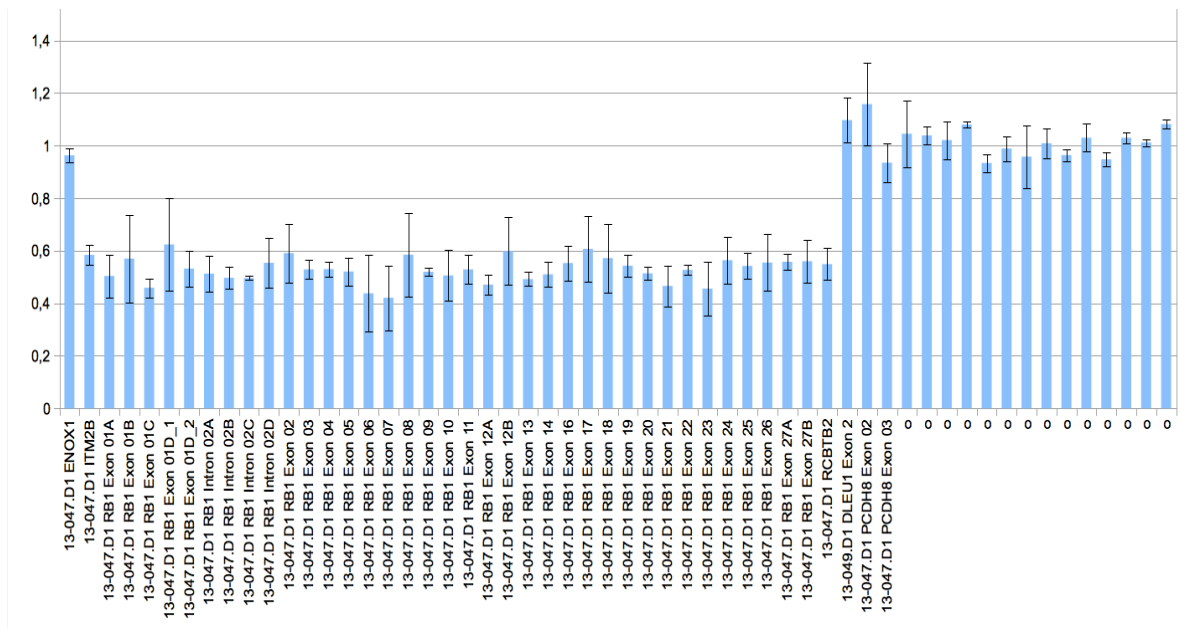


Figura 7. Resultado da MLPA para o paciente P53. Deleção completa de um alelo do gene *RBI*, e parte dos genes *ITM2B* e *RCBTB2*.

O resultado obtido na amostra P53 pôde ser confirmado por meio de FISH (Figuras 8 e 9). O tratamento foi realizado com quimioterapia intravenosa e intraocular e a paciente segue viva e sem doença residual.

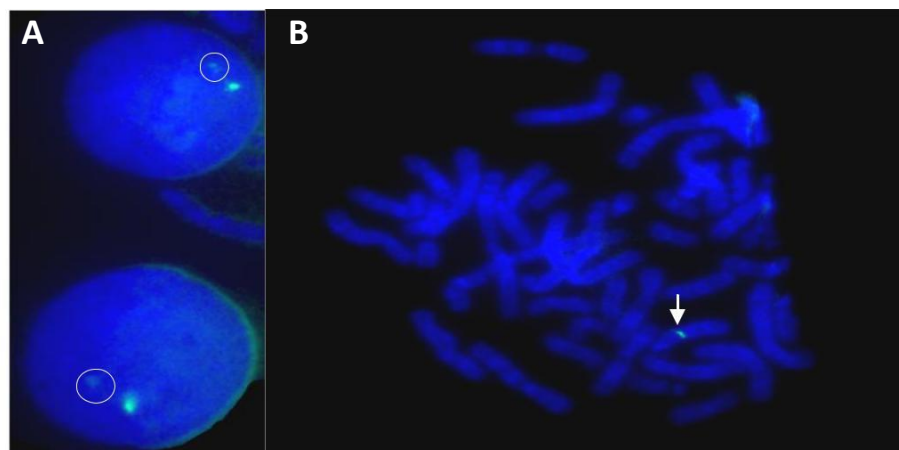


Figura 8. FISH realizada para o paciente P53. **A)** Sonda para a região 13q14 mostrando dois sinais de diferentes intensidades nos núcleos. **B)** Sonda para a região 13q14 marcando apenas um cromossomo, mostrando deleção de um alelo.

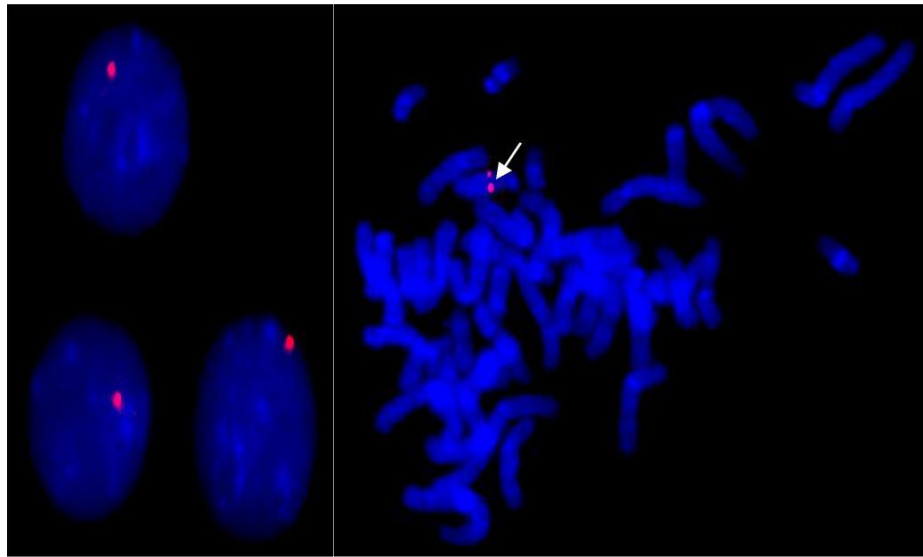


Figura 9. FISH realizada para a paciente P53. Sonda para o gene *RB1* mostrando a deleção de uma cópia do gene em núcleos e metáfase.

Na amostra do paciente P49, foi observada deleção completa de um alelo do gene *RB1* e dos genes *ITM2B*, *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1*, localizados na região 13q14.2, e deleção parcial do gene *ENOX1*, localizado em 13q14.11 (Figura 10).

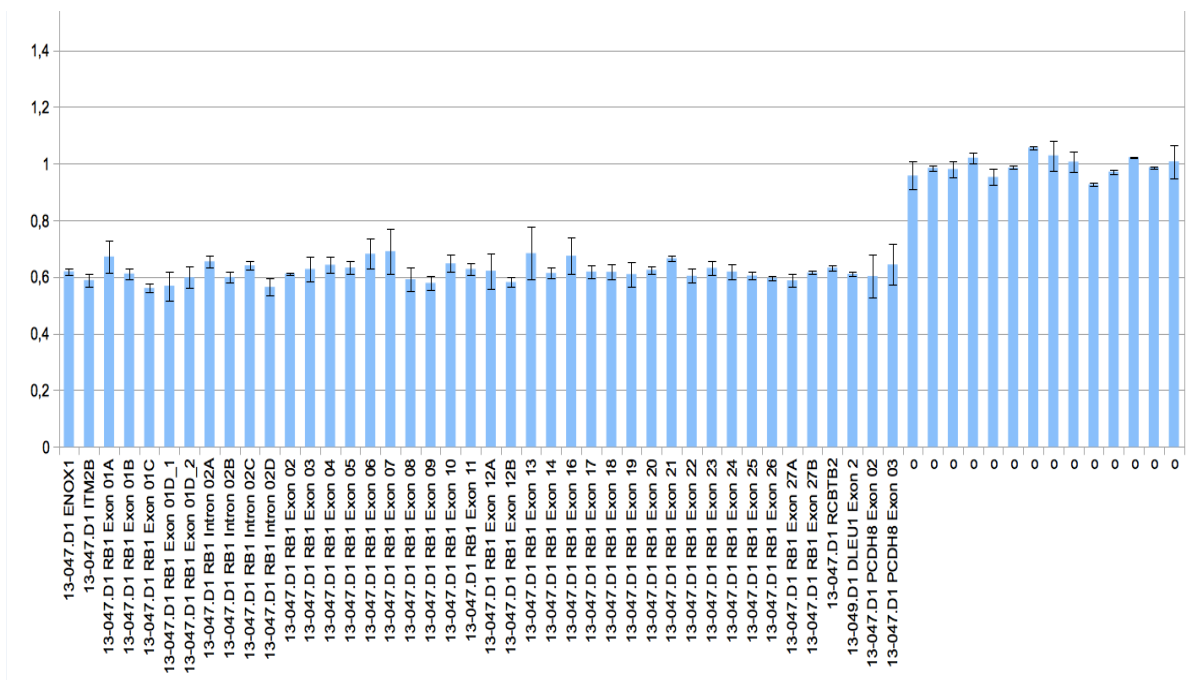


Figura 10. Resultado da MLPA para o paciente P49. Deleção completa de um alelo do gene *RB1*, abrangendo regiões dos genes *ENOX1*, *ITM2B*, *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1*.

A amostra do paciente P48 apresentou amplificação de seis exons consecutivos do gene *RBI* (12 a 17; Figura 11).

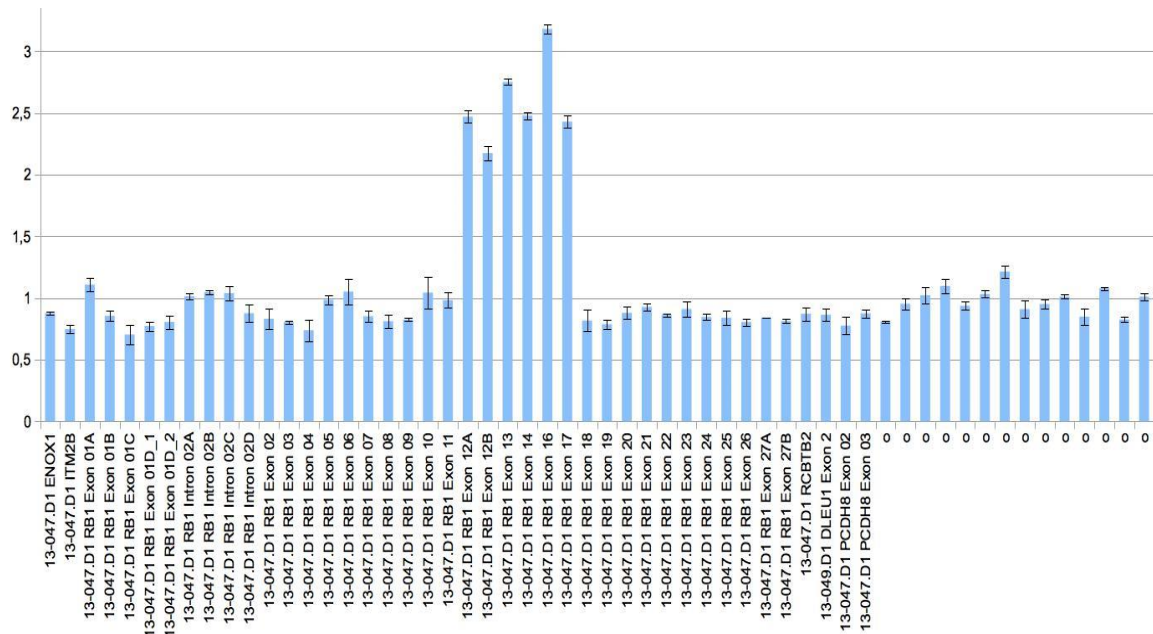


Figura 11. Resultado da MLPA para o paciente P48, mostrando amplificação de 5 exons consecutivos em um alelo do gene *RBI*. Os valores apresentados encontram-se superiores aos valores de duplicação.

5 DISCUSSÃO

O Kit “*SALSA MLPA P047 versão D1*” tem como principal objetivo a investigação de alterações no *locus RBI*, contendo quatro sondas para o intron 2 e sondas para todos os exons do gene *RBI* exceto o exon 15 pela sua proximidade aos 14 e 16. O kit também possui seis sondas complementares a regiões próximas do gene

RBI para auxiliar na caracterização da extensão das deleções e duplicações. Duas sondas hibridizam-se em regiões a montante do gene *RBI*, no exon 6 do gene *ENOX1* (*Ecto-nox disulfide-thiol exchanger 1*) e no exon 5 do gene *ITM2B* (*Integral membrane protein 2b*), e quatro hibridizam-se em regiões a jusante do gene *RBI*, no exon 8 do gene *RCBTB2* (*RCC1 domain- and BTB domain-containing protein 2*), no exon 2 do gene *DLEU1* (*Deleted in lymphocytic leukemia, 1*) e nos exons 2 e 3 do gene *PCDH8* (*Protocadherin 8*).

O kit apresenta ainda 14 sondas com localizações em vários autossomos que são relativamente estáveis em tumores humanos. Essas sondas, utilizadas para controle das reações de MLPA, são apresentadas na Tabela 1 de acordo com o local de hibridização.

Tabela 1: Localização das sondas utilizadas para controle da reação.

Gene	Exon	Posição Cromossômica	Gene	Exon	Posição Cromossômica
<i>TTC39A</i>	4	01p32.3	<i>SMPD1</i>	2a	11p15.4
<i>SLC9A2</i>	2	02q12.1	<i>COL2A1</i>	35	12q13.11
<i>SATB2</i>	12	02q33.1	<i>MYH7</i>	12	14q11.2
<i>DNAH5</i>	48	05p15.2	<i>UBE3A</i>	6	15q11.2
<i>IL4</i>	1	05q31.1	<i>MYO5B</i>	8	18q21.1
<i>PCSK5</i>	22	09q21.13	<i>KCNJ6</i>	4	21q22.13
<i>MYBPC3</i>	31	11p11.2	<i>LARGE</i>	11	22q12.3

5.1 Paciente P28

Paciente P28, sexo masculino, foi diagnosticado aos nove meses de idade com retinoblastoma bilateral, apresentando como primeiro sintoma a leucocoria, notada desde os dois meses. Na amostra deste paciente foi encontrada deleção do exon 23. Segundo Harbour (1998) o exon 23 (assim como os exons 24, 25, 26 e 27) participa do domínio C -Terminal da pRb (RbC). O RbC é essencial para a ligação a *E2F-DP* (Figura 12) e, conseqüentemente, para que seja efetivada a ação da pRB sobre a inibição do crescimento celular (HIEBERT, 1993).

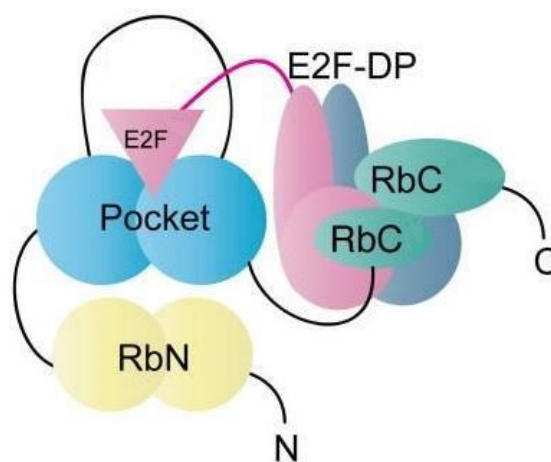


Figura 12. Esquema evidenciando a participação do domínio C -Terminal da pRB (RbC) na ligação com o complexo *E2F-DP*. O *pocket* é formado pelos domínios A e B e também participa da ligação. A porção RbN representa o domínio N-Terminal. Adaptada de Burtke e colaboradores (2014).

O tratamento foi realizado com quimioterapia, laserterapia e crioterapia do olho direito e enucleação do olho esquerdo. O paciente segue vivo e sem doença residual.

5.2 Paciente P12

Paciente P12, sexo masculino, foi diagnosticado aos 17 meses com retinoblastoma unilateral em globo ocular direito e restrito à região intraocular. A história familiar constatou avô materno com câncer de estômago aos 70 anos e tia materna com síndrome mielodisplásica, porém sem relato de neoplasias oculares, crianças com atraso de desenvolvimento/retardo mental ou síndromes malformativas. Na amostra deste paciente foi possível detectar deleção total de um alelo do gene *RB1* e parcial de outros genes localizados na região 13q14.2, como o *ITM2B* e *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1*.

O gene *ITM2B* está envolvido com o metabolismo de proteínas β -amilóides e alterações são associadas a casos de demência por amiloidose e distrofia retiniana com disfunção retiniana interna e anormalidades de células ganglionares. Lee e colaboradores (2007) sugeriram que *ITM2B* faz parte de um conjunto de genes relacionados a genes supressores de tumor como *RB1*, e que a perda de função de *ITM2B* precede a perda funcional do *RB1* durante o desenvolvimento tumoral. Sugeriram ainda que *ITM2B* poderia proporcionar vantagem de crescimento celular no estado de haplo-insuficiência de *RB1* ou contribuir para o desenvolvimento tumoral após perda da função de ambos os alelos de *ITM2B*.

O gene *RCBTB2* está associado à condensação da cromatina e foi descrito como supressor de tumor no câncer de próstata ao observarem a redução da sua expressão no tecido tumoral (LATIL et al., 2002; ROSS-ADAMS et al., 2015). O gene *PCDH8* foi descrito como supressor tumoral no câncer de mama por Yu e colaboradores em 2008 e em câncer gástrico por Zhang e colaboradores (2012). A deleção de *PCDH8* associada à deleção do gene *RB1* foi descrito como provável indicador de risco de atraso psicomotor (CASTÉRA et al., 2013; MITTER et al., 2011). O gene *DLEU1* foi descrito principalmente como supressor tumoral em leucemia linfocítica crônica de células B (LIU et al., 1997) e sua deleção foi detectada também em pacientes com lipoma (CREYTENS et al., 2014).

O resultado obtido por MLPA pôde ser confirmado através de cariotipagem, que constatou grande deleção no braço longo do cromossomo 13. Apesar da grande deleção evidenciada, o exame físico morfológico não demonstrou malformações e os exames solicitados para rastreamento de malformações internas (ultrassonografia abdominal,

ecocardiograma e tomografia computadorizada de crânio) também apresentaram resultados normais. As alterações fenotípicas relacionadas com deleções no braço longo do cromossomo 13 são associadas a uma desordem rara denominada síndrome de deleção 13q. Com exceção do retinoblastoma, as outras características fenotípicas geralmente manifestam-se quando a deleção envolve as bandas 13q32, levando a alterações como retardo mental severo, deficiência do crescimento, microcefalia e malformações gastrointestinais ou 13q33 e 13q34 que leva ao retardo mental severo, porém sem deficiência do crescimento ou grandes malformações estruturais (JONES, 1998). Apesar dos pontos de quebra da deleção encontrada no paciente não serem definidos, as regiões 13q32, q33 e q34 provavelmente não foram afetadas, explicando a falta de anomalias no paciente P12 mesmo diante de uma deleção tão expressiva na região 13q.

5.3 Paciente P53

Paciente P53, sexo feminino, foi diagnosticada com retinoblastoma bilateral com um ano e dois meses, tendo como primeiro sintoma o estrabismo, notado desde seis meses de idade. No exame físico foi possível constatar malformações como hímen imperfurado, orelhas baixo implantadas, filtro bem marcado, palato alto, mamilos invertidos, nevos diversos em face e tronco. Na amostra da paciente foi encontrada deleção total do gene *RBI* e parcial dos genes *ITM2B* e *RCBTB2*.

O resultado nesta paciente foi confirmado por FISH através de duas sondas, uma que hibridiza na região 13q14 (Figura 6) e uma específica para o gene *RBI* (Figura 7). 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 apenas um sinal nas metáfases e, nos núcleos, dois sinais de diferentes intensidades. Isso se deve 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 partes da região 13q14 que não foram afetadas pela deleção. Apesar de a paciente apresentar algumas malformações, apenas uma (orelhas baixo implantadas) encaixa-se no quadro de síndrome de deleção 13q (JONES, 1998).

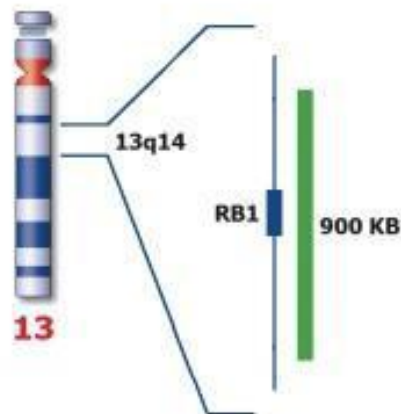


Figura 6. Representação esquemática do cromossomo 13 mostrando a região abrangida pela sonda Poseidon™ Repeat Free™ Chromosome 13 (13q14) Specific. Adaptada de: <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/KRA/KBI-40001.pdf>. (Acessado em 06/01/17).

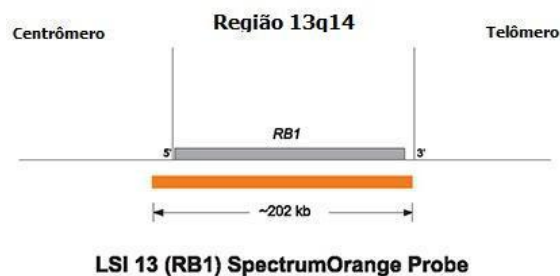


Figura 7. Representação esquemática de parte da região cromossômica 13q14, mostrando a abrangência do gene *RB1* pela sonda para FISH utilizada nesse estudo. Adaptada de: <https://www.molecular.abbott/us/en/chromosome/13.html>. (Acessado em 06/01/17).

5.4 Paciente P49

Paciente P49, sexo feminino, foi diagnosticada com retinoblastoma bilateral com um ano e cinco meses, apresentando estrabismo como primeiro sintoma. Apresentava atraso global do desenvolvimento, sentou sem apoio aos oito meses e, aos dois anos, ainda não andava. A ressonância magnética de órbita apontou massa e calcificação em retina e de crânio com áreas de mielinização.

Na amostra desta paciente foi observada deleção completa de um alelo do gene *RBI* e parcial dos genes *ITM2B*, *RCBTB2*, *PCDH8* e *DLEU1* localizados na região 13q14.2, e deleção parcial do gene *ENOX1*, localizado em 13q14.11. O *ENOX1* está envolvido nas vias de transporte da membrana plasmática. Em algumas neoplasias há variação da expressão da proteína codificada por *ENOX1* quando comparada ao tecido normal. Nos linfonodos a expressão é normalmente baixa (centros germinativos) ou moderada, enquanto nos linfomas não é detectada. O mesmo ocorre no córtex cerebral que se apresenta geralmente com baixa expressão, mas transforma-se em não detectável em grande parte dos casos de glioma. Em casos de câncer renal também há diminuição da expressão até níveis indetectáveis, enquanto células tubulares renais normais apresentam expressão moderada (<http://www.proteinatlas.org/search/enox1>, acessado em 06/01/2017).

A paciente foi a óbito em 14 de fevereiro de 2012, impossibilitando a coleta de material para realização de novas técnicas para confirmar o resultado, mas ao dar entrada no INCA já possuía cariotipagem realizada, constando 74 células com deleção intersticial do braço longo do cromossomo 13 e outra linhagem de 26 células com cromossomos normais. Apesar de ser um caso de moisaicismo, este achado confirma a deleção encontrada através do MLPA.

5.5 Paciente P48

O Paciente P48, sexo masculino, foi diagnosticado com retinoblastoma bilateral aos sete meses, tendo como primeiro sintoma a leucocoria.

A amostra deste paciente apresentou amplificação de 6 exons consecutivos do gene *RB1* com estimativas superiores a duplicação já que, segundo o fabricante (MRC Holland), valores acima de 2,15 são considerados ambíguos para consideração do número de cópias. Este resultado ainda não está descrito na literatura. O kit não possui sonda para o exon 15 pela proximidade deste às sondas adjacentes, porém é possível supor que deva estar também amplificado. A região amplificada corresponde a todo o domínio A da proteína pRB, que junto com a região C-Terminal compõe o *pocket* de ligação (Figura 12) de grande importância no crescimento celular por se ligar a oncoproteínas e proteínas reguladoras

(HARBOUR, 1998). Após quimioterapia e laserterapia, o paciente segue vivo e sem doença residual.

6 CONCLUSÃO

A técnica de MLPA mostrou-se eficiente na detecção de rearranjos cromossômicos na região 13q14, identificando desde deleções de apenas um exon a deleções que envolveram mais de um gene. A técnica detectou ainda uma amplificação, mostrando-se abrangente aos diversos tipos de alterações. A confirmação de dois resultados através da citogenética (FISH e cariotipagem) retificou a confiabilidade da técnica de MLPA e assim, os dados reunidos por este trabalho afirmaram a importância do uso desta metodologia para caracterização do primeiro evento mutacional no auxílio ao aconselhamento genético do paciente e de seus familiares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D. H. Retinoblastoma in the 20th Century: Past Success and Future Challenges The Weisenfeld Lecture. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 8, p. 2684, 1 ago. 2005.
- BALMER, A.; ZOGRAFOS, L.; MUNIER, F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5341–5349, 28 ago. 2006.
- BARTUMA, K. et al. A 10-year experience of outcome in chemotherapy-treated hereditary retinoblastoma. **Acta Ophthalmologica**, v. 92, n. 5, p. 404–411, ago. 2014.
- BUCHKOVICH, K. et al. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1097–1105, 22 set. 1989.
- BURKE, J. R. et al. Multiple mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 1, p. 245–255, 9 jan. 2014.

- CASTÉRA, L. et al. Fine mapping of whole RB1 gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 21, n. 4, p. 460–464, abr. 2013.
- CHEN, P.-L. et al. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1193–1198, 22 set. 1989.
- CREYTENS, D. et al. Atypical spindle cell lipoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study emphasizing its relationship to classical spindle cell lipoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 465, n. 1, p. 97–108, 23 jul. 2014.
- DECAPRIO, J. A. et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1085–1195, 22 set. 1989.
- DEVILEE, P.; CLETON-JANSEN, A M.; CORNELISSE, C. J. Ever since Knudson. **Trends in genetics : TIG**, v. 17, n. 10, p. 569–573, 2001.
- DI FIORE, R. et al. RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1676–1687, ago. 2013.
- DICIOMMO, D.; GALLIE, B. L.; BREMNER, R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 10, n. 4, p. 255–69, 2000.
- DIMARAS, H. et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 10, p. 1363–1372, 25 jan. 2008.
- DIMARAS, H. et al. Retinoblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15062, 24 set. 2015.
- GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p.5220–5227, 2006.

- HAMOSH, A. et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). **Human Mutation**, v. 15, n. 1, p. 57–61, 2000.
- HARBOUR, J. W. Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma. Implications for clinical genetic screening. **Ophthalmology**, v. 105, n. 8, p. 1442–1447, 1998.
- HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. **Genes & development**, v. 14, n. 19, p. 2393–2409, 1 out. 2000.
- HIEBERT, S. W. Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 6, p. 3384–3391, jun. 1993.
- JONES, K. L. **mith adr es reconhec veis de malforma es cong nitas**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1998.
- KALLIONIEMI, A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, v. 258, n. 5083, p. 818–821, 1992.
- KLINGER, K. et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). **American journal of human genetics**, v. 51, n. 1, p. 55–65, 1992.
- KNUDSON, A. G.; JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820–823, abr. 1971.
- KRISHNA, S. M.; YU, G.-P.; FINGER, P. T. The effect of race on the incidence of retinoblastoma. **Journal of pediatric ophthalmology and strabismus**, v. 46, n. 5, p. 288–293, 1 set. 2009.
- LATIL, A. et al. CHC1-L, a candidate gene for prostate carcinogenesis at 13q14.2, is frequently affected by loss of heterozygosity and underexpressed in human prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 99, n. 5, p. 689–696, 10 jun. 2002.
- LEE, S. et al. Forerunner genes contiguous to RB1 contribute to the development of in situ neoplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13732–13737, 21 ago. 2007.

- LIU, Y. et al. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. **Oncogene**, v. 15, n. 20, p. 2463–2473, 1997.
- LOHMANN, D. R. et al. The Spectrum of RB1 Germ-Line Mutations in Hereditary Retinoblastoma. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 940–949, 1996.
- LOHMANN, D. R. **RB1 gene mutations in retinoblastoma** **Human Mutation**, 1999.
- LUO, R. X.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Rb Interacts with Histone Deacetylase to Repress Transcription. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 463–473, 1998.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MITTER, D. et al. Genotype–phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 9, p. 947–958, 20 set. 2011.
- MORENO, F. et al. A population-based study of retinoblastoma incidence and survival in Argentine children. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 9, p. 1610–1615, set. 2014.
- ROSS-ADAMS, H. et al. Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1133–1144, set. 2015.
- RUSHLOW, D. E. et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 4, p. 327–334, abr. 2013.
- SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 12, 2002.
- SINGH, S. K. et al. A rare case of adult onset retinoblastoma. **Oman journal of ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 25–27, jan. 2011.

- TOGUCHIDA, J. et al. Complete Genomic Sequence of the Human Retinoblastoma Susceptibility Gene. **Genomics**, v. 17, n. 3, p. 535–543, 1993.
- UHLÉN, M. et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. **Molecular & cellular proteomics**, v. 4, n. 12, p. 1920–1932, dez. 2005.
- VAN VEGHEL-PLANDSOEN, M. M. et al. “Multiplex Ligation-Depending Probe Amplification Is Not Suitable for Detection of Low-Grade Mosaicism.” **European Journal of Human Genetics** 19.9 (2011): 1009–1012.
- WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323–330, 1995.
- YU, J. S. et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 34, p. 4657–4665, 7 ago. 2008.
- ZHANG, H. S.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Active Transcriptional Repression by the Rb–E2F Complex Mediates G1 Arrest Triggered by p16INK4a, TGF β , and Contact Inhibition. **Cell**, v. 97, n. 1, p. 53–61, 1999.
- ZHANG, J. et al. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 329–334, 11 jan. 2012.

ANEXO I

Aprovação do Projeto “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma” pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.



Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2001.

Dr. Héctor N. Seuánez Abreu
Coordenador do Estudo

Referência ao Protocolo 40/00: “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma”.


Prezado Doutor

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA do Instituto Nacional de Câncer, reunido no dia 30 de julho de 2001, **aprovou** o estudo intitulado: Protocolo 40/00 - “Estudos Citomoleculares em Retinoblastoma”, bem como seu Consentimento Livre e Esclarecido.

Estamos encaminhando a documentação pertinente ao CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

De acordo com o fluxograma de aprovação de estudos clínicos vigente, o protocolo lhe está sendo devolvido para que seja encaminhado, por V.S^a, a Fundação Ary Frauzino para providências quanto ao Contrato de Patrocínio.

Atenciosamente


Dr. Luis Otávio Olivatto
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA