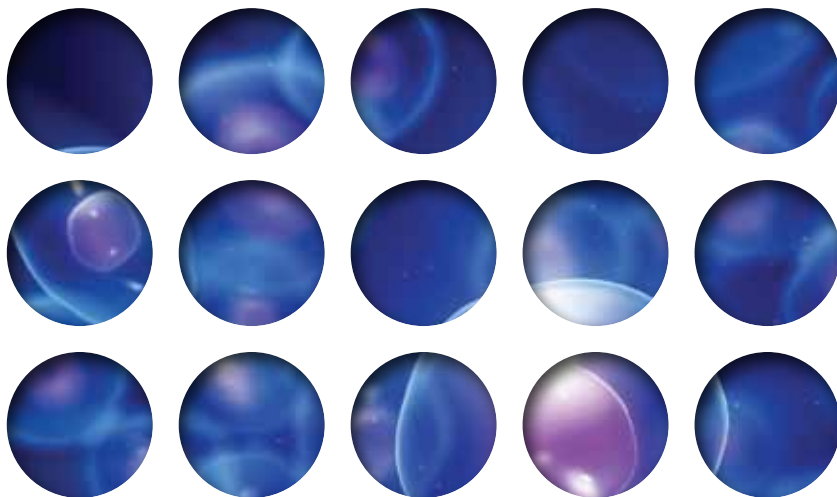




DIAGNÓSTICO EM GENÉTICA MOLECULAR



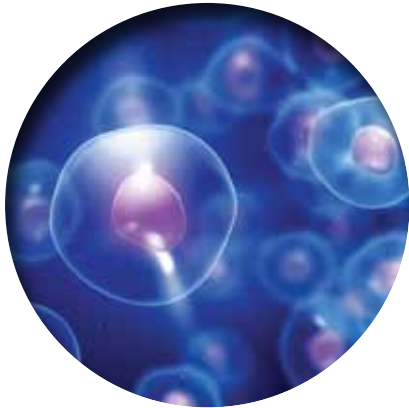
Oncologia



DIAGNÓSTICO EM GENÉTICA MOLECULAR

Oncologia





DIAGNÓSTICO EM GENÉTICA MOLECULAR

Oncologia

A segunda maior causa de mortes por razões naturais no Brasil é o câncer. Contudo, os recentes e contínuos avanços nos estudos das bases genéticas da carcinogênese têm produzido conhecimentos clínicos práticos, principalmente na forma de testes genéticos preditivos. Estima-se que cerca de 3.000 doenças decorram de mutações no genoma, apresentando potencial de serem identificadas através de exames laboratoriais.

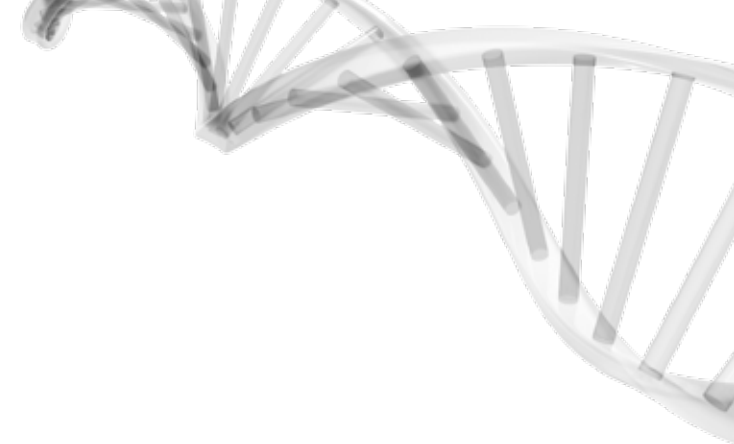
Os recentes avanços da Genética Molecular têm permitido definir o risco hereditário de determinados tipos de câncer através de exames preventivos que alcançam nessa doença os melhores resultados.

Estes testes avaliam a suscetibilidade ao evento oncológico, uma vez que o desenvolvimento do câncer depende da interação de fatores genéticos e ambientais. Atualmente, testes genéticos diretos permitem identificar mutações em genes supressores de tumor e protooncogenes, associados ao câncer hereditário de mama, ovário e de câncer colorretal. Recomendações sobre medidas de prevenção no câncer de mama e de ovário têm sido sugeridas para pessoas com teste de

predisposição genética positivo (portadores da mutação encontrada em parente com câncer) ou pertencentes a famílias com múltiplos casos de câncer de mama e ovário.

Dentre estes avanços, podemos contar também com o auxílio no diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica (LMC), no monitoramento da doença residual mínima e para futuras comparações com alterações das crises blásticas.

A Genética Molecular do Hermes Pardini disponibiliza à classe médica e aos pacientes uma série de testes genéticos que visam o diagnóstico das leucemias e seu acompanhamento terapêutico, como também a presença de eventos genéticos que predisõem a alguns tipos de câncer de forma segura e confiável. Estamos ampliando o quadro de exames genéticos para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico em oncologia, no intuito de oferecer o que há de mais moderno e, principalmente, com embasamento científico sólido, à classe médica, aos pacientes e seus familiares.



Índice

APC - Mutações I1307K E E1317Q no gene APC para Polipose adenomatosa familiar	4	Microquimerismo em Transplante de Medula	11
APC - Sequenciamento do exon 15 do gene APC	4	Neurofibromatose tipo 1 (Neurofibromatose de Von Recklinghausen)	11
APC - Sequenciamento completo	4	Neurofibromatose tipo 2	12
BRCA1 - Sequenciamento gênico	5	P53 -Sequenciamento gênico	13
BRCA2 - Sequenciamento gênico	5	Rearranjo BCL1/JH t(11,14)	13
BRCA1 e BRCA2, sequenciamento gênico completo	6	Rearranjo BCL2/JH t(14,18)	14
Câncer de colon - Sequenciamento do gene MYH	7	Rearranjo BCL6	15
Gene FLT3 - Prognóstico molecular de LMA	7	RET- Sequenciamento do Protooncogene RET: exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 individualizados	15
HNPCC - Estudo molecular do gene MLH1	8	Retinoblastoma - Estudo molecular do gene RB1	16
HNPCC - Estudo molecular do gene MSH2	8	Translocação BCR-ABL - Qualitativo	16
Instabilidade de microssatélites	9	UGT1A1, polimorfismo do gene - Toxicidade do irinotecan	16
JAK2 V617F (Policitemia vera, Trombocitemia e Mielofibrose idiopática)	10		
K-RAS - Sequenciamento exon-intron do gene	10		

APC - Mutações I1307K E E1317Q no gene APC para Polipose adenomatosa familiar

A polipose adenomatosa familiar (FAP) é uma doença autossômica dominante caracterizada por predisposição a câncer. Os afetados desenvolvem numerosos pólipos adenomatosos no cólon e no reto, sendo que alguns deles podem evoluir para carcinoma colorretal se não forem tratados cirurgicamente. Os polimorfismos I1307K e E1317Q no gene APC têm apresentado papel importante na predisposição a carcinomas e adenomas colorretais. A inativação do gene APC é geralmente um dos eventos mais precoces na tumorigênese colorretal. A alta frequência de perda na região do cromossomo 5 que inclui o gene APC (5q21) sugere que a perda da heterozigose desse gene esteja envolvida na carcinogênese do cólon nos pacientes com FAP.

MÉTODO

PCR + sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

25 dias úteis

APC - Sequenciamento do exon 15 do gene APC

LOCALIZAÇÃO: 5q21-q22

HEREDITARIEDADE: Autossômica Dominante

INCIDÊNCIA: 2,5-3:100.000

MÉTODO

PCR e sequenciamento do exon 15 do gene APC

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

50 dias úteis

APC - Sequenciamento completo

A polipose adenomatosa familiar (FAP) é uma doença autossômica dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de numerosos pólipos adenomatosos e um grande risco para o surgimento de tumores colorretais. A inativação do gene APC é geralmente um dos eventos mais precoces na tumorigênese colorretal. A alta frequência de perda na região do cromossomo 5 que inclui o gene APC (5q21) sugere que a perda da heterozigose desse gene esteja envolvida na carcinogênese do cólon nos pacientes com FAP.

MÉTODO

PCR + sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.
É obrigatório o envio do questionário para APC, disponível no link:
Apoio a Laboratórios - Questionários Obrigatórios.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

60 dias úteis

4

BRCA1 - Sequenciamento gênico

Existem inúmeros fatores que aumentam o risco de mulheres desenvolverem câncer de ovário ou mama. Dentre esses, a predisposição genética é certamente um dos mais significativos. Os genes BRCA1 e BRCA2 codificam proteínas que participam do reparo das lesões do DNA. Mutações inativadoras destes genes levam à susceptibilidade aos cânceres de mama e ovário.

Apesar de serem descritas mais de 400 mutações no gene BRCA, este estudo avalia as que são encontradas de forma recorrente e que parecem ter um efeito fundador. A ausência de mutações nos fragmentos avaliados não exclui a possibilidade de existirem outras mutações relacionadas a predisposição aos cânceres de mama e ovário. Nesse caso, um estudo mais detalhado dos genes BRCA1 e BRCA2 pode ser necessário.

A amplificação é realizada mediante primers específicos para o gene BRCA1, para fragmentos de exons e sequências de introns flanqueadoras dos exons 1 a 20. Especificamente para o exon 11 que corresponde a cerca de 60%

do gene completo e onde se acumulam mais de 52% das mutações observadas, são amplificados 18 fragmentos em separado para efetuar o sequenciamento. Esta técnica tem sensibilidade de 100%. A análise é realizada baseando-se nas sequências de referência do *Breast Cancer Information Core* (BIC database).

MÉTODO

Sequenciamento do gene BRCA1

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias úteis

BRCA2 - Sequenciamento gênico

Existem inúmeros fatores que aumentam o risco de mulheres desenvolverem câncer de ovário ou mama. Dentre esses, a predisposição genética é certamente um dos mais significativos. Os genes BRCA1 e BRCA2 codificam proteínas que participam do reparo das lesões do DNA. Mutações inativadoras destes genes levam à susceptibilidade aos cânceres de mama e ovário.

Apesar de serem descritas mais de 400 mutações no gene BRCA, este estudo avalia as que são encontradas de forma recorrente e que parecem ter um efeito fundador. A ausência de mutações nos fragmentos avaliados não exclui a possibilidade de existirem outras mutações relacionadas a predisposição aos cânceres de mama e ovário. Nesse caso, um estudo mais detalhado dos genes BRCA1 e BRCA2 pode ser necessário.

A amplificação é realizada mediante primers específicos para o gene BRCA2, para fragmentos de exons, incluindo sequências de introns flanqueadoras dos exons 1 a 27. Para os exons 10 e 11, que correspondem a cerca de 70%

do gene completo e onde se acumulam mais de 52% das mutações observadas, são amplificados 9 fragmentos em separado para o exon 10 e 16 fragmentos em separado para o exon 11, para efetuar o sequenciamento completo. Esta técnica tem sensibilidade de 100%. A análise é realizada baseando-se nas sequências de referência do *Breast Cancer Information Core* (BIC database).

MÉTODO

Sequenciamento do gene BRCA2

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias úteis

5

BRCA1 e BRCA2, sequenciamento gênico completo

Estima-se que a prevalência de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 na população em geral seja de 0.1% a 0.2%. A incidência destas mutações é maior em descendentes de judeus Ashkenazi, chegando a 1% . Em cerca de 10% a 16% dos casos de câncer de mama, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são encontradas. Estas mutações correspondem a 75% dos casos de câncer familiar. No câncer de ovário, 10% dos casos são portadores de mutações do BRCA1 e BRCA2.

O principal objetivo dos testes genéticos é a identificação das mulheres com risco genético de desenvolver câncer de mama e ovário. A *American Society of Clinical Oncology* e o *National Society of Genetic Counselors* indica investigação genética das mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 nas seguintes situações:

- Mulheres com história pessoal de câncer ou parentes próximos com câncer de mama.
- Famílias com múltiplos indivíduos com câncer de mama ou ovário.
- Mulher jovem com câncer de mama bilateral ou câncer de ovário e mama.
- Homens com história pessoal ou familiar de câncer de mama masculino.
- Mulheres com história pessoal ou familiar de câncer de ovário.
- Mulheres descendentes de judeus Ashkenazi.

A realização da pesquisa das mutações do BRCA1 e BRCA2 em pacientes com história pessoal de câncer de mama é justificada pela maior chance de recorrência da neoplasia na mama contra-lateral nas que são portadoras dessas mutações.

A amplificação do gene BRCA1 é realizada mediante primers específicos direcionados aos fragmentos de exons e incluem sequências de introns flanqueadoras dos exons 1 a 20. Para o exon 11 do BRCA1, que corresponde a cerca de 60% do gene completo e onde se acumulam mais de 52% das mutações observadas, são amplificados 18 fragmentos em separado, para efetuar o sequenciamento completo deste exon. Para o gene BRCA2, a amplificação é realizada mediante primers específicos para os fragmentos de exons, incluindo sequências de introns flanqueadoras dos exons 1 a 27. Para o exon 10 e 11 do BRCA2, que correspondem a cerca de 70% do gene completo e onde se acumulam mais de 52% das mutações observadas, são amplificados 9 fragmentos em separado para o exon 10 e 16 fragmentos em separado para o exon 11, para efetuar o sequenciamento completo destes exons. A técnica de sequenciamento tem sensibilidade de 100%. A análise é realizada baseando-se nas sequências de referência do *Breast Cancer Information Core* (BIC database).

MÉTODO

Sequenciamento dos genes BRCA1 e BRCA2.

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias úteis

6

Câncer de colon - Sequenciamento do gene MYH

A polipose adenomatosa familiar é uma síndrome de predisposição de câncer de cólon no qual centenas de milhares de pólipos de cólon pré-cancerosos se desenvolvem, começando como média aos 16 anos (7-36 anos). Aos 35 anos 95% dos indivíduos com polipose adenomatosa familiar tem pólipos. Sem colectomia, o câncer de cólon é inevitável. A idade média do diagnóstico de câncer de cólon em indivíduos sem tratamento está entre os 39 anos (34-43 anos). As manifestações são: apresentar pólipos no fundo gástrico e duodeno, osteomas, anormalidades dentais, hipertrofia congênita do epitélio de pigmentação retinal, tumores em outros tecidos e associação a outros cânceres.

MÉTODO

PCR e sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

35 dias úteis

Gene FLT3 - Prognóstico molecular de LMA

FLT3 (FMS-like tyrosina kinase 3) é um receptor de tirosina quinase, com função bem conhecida na sobrevida, proliferação e diferenciação celular. É expresso normalmente em células progenitoras hematopoiéticas, o que não ocorre nas células hematopoiéticas diferenciadas. Por sua vez, a linhagem B e as leucemias mielóides agudas (LMA) apresentam super-expressão da proteína FLT3.

As FLT3/ITD são duplicações de 3 a 400 bp no exon 11, sem mudança de matriz de leitura, que afetam cerca de 23% dos pacientes LMA, principalmente quando há contagem alta de células brancas sanguíneas e LMA tipo FAB Mo e M5. Sua presença indica pior prognóstico em pacientes adultos e pediátricos e há evidências que ITD maiores representam maior desvantagem frente às ITD menores.

A mutação pontual FLT3/D835, situada no exon 20, está presente em aproximadamente 8 a 12% dos pacientes LMA. A menor sobrevida relacionada a FLT3/D835 já foi estimada em até 3 anos em comparação a pacientes LMA com genótipo FLT3/D835 selvagem.

As duas mutações são consideradas instáveis, visto que a porcentagem de alelos mutados do gene FLT3 varia durante o curso da doença, inclusive no tratamento e na(s) recaída(s); além do próprio comprimento da ITD diferir em um mesmo paciente, nas várias etapas da LMA.

Deve-se dar preferência para a pesquisa de amostras de sangue de medula óssea em EDTA, a fim de aumentar a sensibilidade do teste, uma vez que o sangue periférico pode conter um número muito baixo de blastos, principalmente após tratamento quimioterápico. Apesar do risco de resultados falso negativos, o uso do sangue periférico somente é recomendado em casos peculiares, por exemplo, nos quais a punção medular representa risco ao paciente.

7

MÉTODO

Mutação FLT3-D835 - PCR - RFLP
Mutação FLT3-ITD - PCR-Fluorescente e Genotipagem em Sequenciador Automático

CONDIÇÃO

Preferencialmente sangue de medula óssea em EDTA - 3mL
Sangue Total em EDTA: Casos especiais após consulta com o setor - 3mL

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

10 dias úteis

HNPCC - Estudo molecular do gene MLH1

O câncer colorretal (CCR) é a 5ª causa de morte por câncer mais frequente no Brasil, sendo que 10 % a 15 % dos casos diagnosticados correspondem a CCR hereditário, principalmente sob a forma de Câncer Colorretal Hereditário Não Polipóide (HNPCC). A HNPCC é uma síndrome autossômica dominante de penetrância incompleta, ou seja, apenas parcela dos indivíduos portadores do alelo mutante desenvolverá a doença.

Os pacientes com HNPCC apresentam como principal característica genética uma perda de função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA: MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 e PMS2. O resultado desta incapacidade de reparo é o acúmulo de mutações genéticas no DNA, o qual irá desencadear o processo de carcinogênese da HNPCC. Dentre os genes de reparo, os genes MSH2 E MLH1 contêm a maioria das mutações atualmente conhecidas responsáveis pela HNPCC, representando cerca de 90% dos casos.

Uma vez realizado o estudo de instabilidade de microssatélites dos pacientes com câncer colorretal e este se apresentar RER(+), é recomendado prosseguir a análise genética dos genes de reparo MLH1 e MSH2,

que são predominantemente responsáveis pelos erros de replicação. Detectada uma mutação patogênica em um determinado segmento de um destes genes, é recomendado que os familiares de primeiro grau dos pacientes com HNPCC também tenham os genes MLH1 e MSH2 analisados. Os indivíduos que apresentam a mutação patogênica causadora do erro de reparo devem ter acompanhamento médico regular e adotar medidas preventivas, visando uma maior sobrevida.

MÉTODO

Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

- Até 2 dias à temperatura ambiente.
- Até 5 dias refrigerado de 2° a 8°C

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias úteis

8

HNPCC - Estudo molecular do gene MSH2

Os pacientes com HNPCC apresentam como principal característica genética uma perda de função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA: MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 e PMS2. O resultado desta incapacidade de reparo é o acúmulo de mutações genéticas no DNA, o qual irá desencadear o processo de carcinogênese da HNPCC. Dentre os genes de reparo, os genes MSH2 E MLH1 contêm a maioria das mutações atualmente conhecidas responsáveis pela HNPCC, representando cerca de 90% dos casos.

Uma vez realizado o estudo de instabilidade de microssatélites dos pacientes com câncer colorretal e este se apresentar RER(+), é recomendado prosseguir a análise genética dos genes de reparo MLH1 e MSH2, que são predominantemente responsáveis pelos erros de replicação. Detectada uma mutação patogênica em um determinado segmento de um destes genes, é recomendado que os familiares de primeiro grau dos pacientes com HNPCC também tenham os genes MLH1 e MSH2 analisados. Os indivíduos que apresentam a mutação patogênica causadora do erro de reparo devem ter acompanhamento médico regular e adotar medidas preventivas, visando uma maior sobrevida.

MÉTODO

Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

- Até 2 dias à temperatura ambiente.
- Até 5 dias refrigerado entre 2° a 8°C.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias úteis

Instabilidade de microssatélites

O câncer colorretal (CCR) é a 5ª causa de morte por câncer mais frequente no Brasil, sendo que 10 % a 15 % dos casos diagnosticados correspondem a CCR hereditário, principalmente sob a forma de Câncer Colorretal Hereditário Não Polipóide (HNPCC), também conhecido como Síndrome de Linch. A HNPCC é uma síndrome autossômica dominante de penetrância incompleta, ou seja, apenas parcela dos indivíduos portadores do alelo mutante desenvolverá a doença.

Apesar da penetrância incompleta, a detecção de mutação nos genes de reparo, indiretamente através da MSI, é de fundamental importância para o direcionamento do tratamento e a prevenção da evolução da HNPCC, uma vez que pode oferecer informações para os indivíduos portadores e familiares sobre o risco de desenvolver o câncer. Sendo diagnosticado o câncer em seu estágio precoce, a possibilidade de cura é significativamente maior. A adoção de medidas preventivas se baseia em colonoscopia a partir dos 20-25 anos, ultra-som pélvico e transvaginal, adequação da dieta (rica de Ca++ e fibras), colectomia profilática, urina rotina e endoscopia digestiva alta (EDA).

Enfim, os testes genéticos direcionam o paciente a procurar acompanhamento clínico para si e seus familiares e adotar medidas preventivas, o que contribui para uma maior sobrevida.

O estudo é realizado comparando o perfil de microssatélites em DNA extraído de tumores com o DNA extraído de tecido não tumoral. Utilizado para prognóstico de câncer colo-retal.

MÉTODO

PCR fluorescente

CONDIÇÃO

- 1 amostra de tecido tumoral e 1 amostra de tecido normal para comparação (obrigatório), sendo:
- Amostra de tecido normal: 1 tubo de Sangue Total colhido em EDTA ou tecido fresco (3cm) em soro ou água.
 - Amostra de tecido tumoral: tecido parafinado ou tecido fresco em soro ou água.

Tecidos frescos não devem ser armazenados em formol, pois este degrada o material genético.

IMPORTANTE

O teste molecular Instabilidade de Microssatélites está dividido em 2 mnemônicos diferentes, visando a diminuição no tempo de liberação e no custo do exame:

1. Instabilidade de Microssatélites - **TECIDO FRESCO [IMS |DIV]**
 2. Instabilidade de Microssatélites - **PARAFINA [IMS-PA |DIV]**
-

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

- Sangue e Tecido: Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.
 - Bloco de Parafina: temperatura ambiente.
-

TEMPO DE LIBERAÇÃO

Tecidos frescos: 21 dias úteis
Bloco parafina: 30 dias úteis

9



JAK2 V617F (Policitemia vera, Trombocitemia e Mielofibrose idiopática)

A associação de JAK2 com desordens mieloproliferativas (MPDS), incluem Policitemia Vera(PV), Trombocitemia(ET) e Mielofibrose Idiopática(IMF). PV está associada ao aumento do número de precursores eritróides (eritrócitos),causando um aumento no volume sanguíneo, tornando-o mais espesso, de modo que o sangue passa a fluir com menor facilidade através dos pequenos vasos sanguíneos, podendo complicar para eventos trombóticos. Na trombocitemia, os megacariócitos tornam-se anormais e produzem plaquetas em excesso, levando à formação espontânea de coágulos, que provocam a obstrução do fluxo sanguíneo. Na mielofibrose ocorre um envolvimento dos fibroblastos (células que produzem tecido fibroso ou conjuntivo), que parecem ser estimulados por células precursoras anormais, possivelmente megacariócitos (células que produzem plaquetas).

A troca de um nucleotídeo guanina por uma timina no éxon 12 do gene Janus Quinase 2(JAK2) representa uma mutação que pode ser adquirida e está presente na linhagem mielóide. Ocorre uma substituição do ami-

noácido fenilalanina por valina no códon 617,causando uma ativação constitutiva da Tyrosina kinase, que é responsável por crescimento celular. Esta mutação está presente em 66% dos casos de policitemia Vera, 23,6% de trombocitemia essencial e 35,6% de mielofibrose crônica, tornando-a um importante auxílio diagnóstico.

MÉTODO

PCR Qualitativo em Tempo Real com Taq Man

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA ou Medula Óssea em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

7 dias úteis

10

K-RAS - Sequenciamento exon-intron do gene

Implicado em diversos tumores: pâncreas (80-90%)*, cólon e reto (25-60%), pulmão (25-60%), próstata (0-25%), pele (0-25%), tiróides (0-60%), fígado (10-25%), ovário (0-50%), endométrio (10-40%), rim (0-50%), cérebro (0-15%), seminoma (10-45%), leucemia aguda não linfocítica e mielodisplasia (5-15%), bexiga (5%), cabeça e pescoço (10%), mama (10%).

*Frequência de mutação em K-RAS

MÉTODO

PCR e sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

25 dias úteis

Microquimerismo em Transplante de Medula

Este exame é indicado para pacientes que se submetem ao transplante de medula a fim de se verificar o quimerismo. A semelhança do padrão genético observado entre o swab bucal e o sangue/medula do paciente indica que não houve a formação de quimerismo, ou seja, o transplante não foi eficiente. No entanto, uma vez obtido diferente padrão entre o swab bucal e o sangue/medula do paciente, há indicação da eficiência do transplante. O encontro de 3 ou mais alelos para um mesmo marcador indica a presença simultânea de resquícios da medula do paciente somada a nova medula recebida do doador.

Neurofibromatose tipo 1 (Neurofibromatose de Von Recklinghausen)

Neurofibromatose 1 (NF1) é caracterizada por manchas café com leite, neurofibromas dérmicos múltiplos e nódulos de Lisch na íris. É uma das doenças autossômicas dominantes mais frequentes na espécie humana, com incidência entre 1:3.000 e 1:5.000 nascidos vivos.

Mutações em heterozigose no gene NF1, localizado no cromossomo 17, são responsáveis pela maior parte dos casos. Mais de 500 mutações diferentes já foram identificadas. Este gene codifica uma proteína denominada neurofibromina que parece atuar como supressor tumoral.

O diagnóstico da NF1 é baseado principalmente nos achados clínicos. Testes moleculares confirmatórios podem ser necessários em alguns pacientes que não preenchem completamente os critérios clínicos. Cerca de 50% dos casos são atribuíveis a mutações novas, sem que se identifique outros afetados nas famílias.

O diagnóstico pré-natal da NF1 poderá ser realizado por meio de análise direta de DNA quando uma mutação específica for identificada na família. O teste molecular disponibilizado avalia a presença de deleções e duplicações por meio de MLPA e de mutações via sequenciamento.

MÉTODO

PCR STR Fluorescente e genotipagem em sequenciador automático

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA e Swab bucal. Se possível enviar uma amostra (sangue ou swab bucal) do doador

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

10 dias úteis

São realizadas análises do gene NF1, com as seguintes possibilidades de testes:

- Análise do gene NF1 por MLPA em Sangue Total
- Análise do gene NF1 por sequenciamento em Sangue Total
- Diagnóstico pré-natal de neurofibromatose NF1 e NF2

11

MÉTODO

MLPA: deleções e duplicações
Sequenciamento: mutações

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA ou swab bucal.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias uteis

Neurofibromatose tipo 2

A Neurofibromatose 2 (NF2) é uma doença autossômica dominante caracterizada por schwannoma vestibular bilateral que se manifesta antes de 30 anos e outros tumores (schwannomas de outros nervos cranianos e periféricos, meningiomas, ependimomas e astrocitomas). A NF2 apresenta grande variabilidade de expressão clínica e a penetrância é completa. A incidência é de 1 caso para cerca de 40 000 nascidos vivos.

A NF2 é causada pela inativação ou perda dos dois alelos do gene supressor de tumor NF2, localizado no braço longo do cromossomo 22. Cerca de 50% dos casos são hereditários, enquanto os demais resultam de mutações novas sendo que muitos deles representam mosaicismos somáticos. O gene NF2 tem 110 kb e 17 exons e codifica a proteína merlina ou schwannomina. A merlina mutante provavelmente inibe a adesão celular, havendo correspondência entre o tipo de mutação e a gravidade da neurofibromatose.

São realizadas análises do gene NF2, com as seguintes possibilidades de testes:

- Análise do gene NF2 por MLPA em Sangue Total
- Análise do gene NF2 por sequenciamento em Sangue Total

- Diagnóstico pré-natal de neurofibromatose NF1 e NF2
- *Screening* para neurofibromatose tipo II por MLPA. Para estudo das grandes deleções e duplicações genéticas no cromossomo 22q12, onde se situa o gene NF2, utiliza-se a técnica de MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification*), a qual permite a visualização de mutações em heterozigose e em homozigose. O teste apresenta 95% de sensibilidade.

MÉTODO

MLPA: deleções e duplicações
Sequenciamento: mutações

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA ou swab bucal.

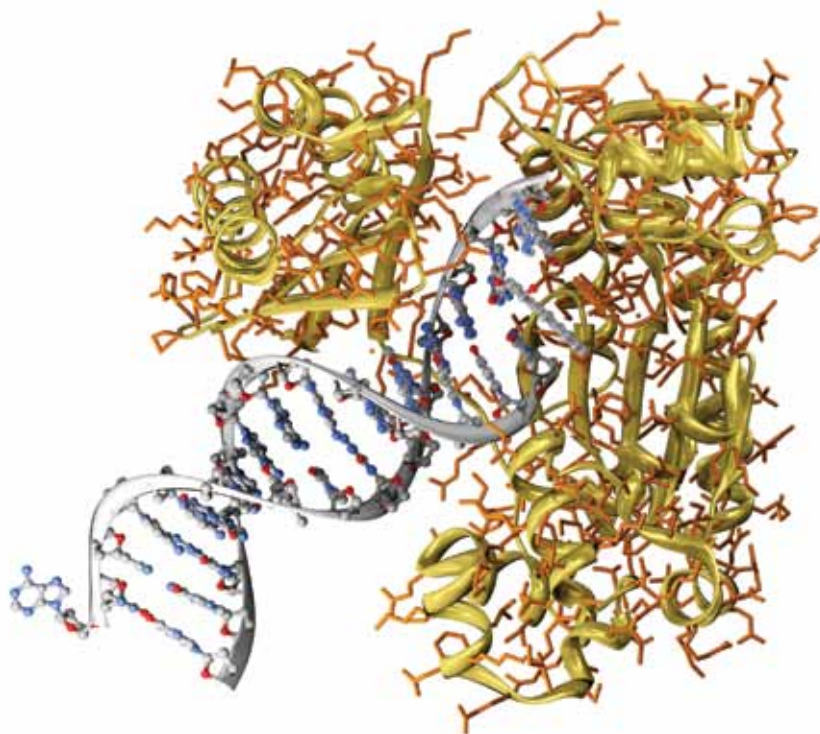
CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

40 dias uteis

12



P53 -Sequenciamento gênico

Implicado em:

- Síndrome de Li-Fraumeni, esta síndrome se caracteriza pela aparição de sarcoma e câncer de primeiro grau antes dos 45 anos e apresenta herança autossômica dominante. As mutações germinais são variadas, mas a maioria se localiza nos éxons 4 a 10 do gene p53.
- Enfermidade hematológica
 - 20 - 30% dos casos de CML
 - 5% dos casos MDS e 15% de ANLL
 - 2% de ALL
 - 15% de CLL
 - 5-10% de mielomas múltiplos.
 - 60-80% da enfermidade Hodgkin
- Câncer de pele: Mutações em TP53 se detectam em 40% dos carcinomas de células basais e escamosas, enquanto que são infrequentes em melanoma maligno.
- Câncer de mama: 25% dos casos de câncer de mama apresenta mutações em TP53.
- Câncer de cabeça e pescoço: 40-60% dos cânceres de cabeça e pescoço apresentam mutações em TP53.

- Câncer de pulmão: 40% dos cânceres de pulmão apresentam as mutações G>T no codón 157, 158, 245, 248, 249 e 273 no gene TP53.
- Câncer de esôfago: 45% dos cânceres de esôfago apresentam mutações no codón 175, 176, 248, 273, 282 no gene TP53.
- Câncer de fígado: em 20-50% dos casos há a perda de 1p, 4q, 5p, 5q, 8q, 13q, 16p, 16q, y 17p. Também aparece mutação no codón 249 relacionado com a aflatoxina B1 na zona de China e África.
- Câncer gástrico: 30% dos cânceres gástricos apresentam mutações em TP53.

MÉTODO

PCR e sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

22 dias úteis

Rearranjo BCL1/JH t(11,14)

O gene codifica a ciclina D1; 295 aminoácidos; 36 kDa.

EXPRESSIONO: não há uma expressão normal em linfócitos; expressão dependente de ciclo celular: máxima em G1, mínima em S.

LOCALIZAÇÃO: principalmente nuclear.

FUNÇÃO: Controle do ciclo celular: Progressão de G1 a G1/S; forma complexos com CDK4 e 6; fosforilação de RB1 pela ciclina D1/CDK4; inibida por P21, P15 e P16

ENTIDADE: t(11;14)(q13;q32)/B-cell . BCL1 - IgH.

PATOLOGIA: t(11;14) detecta-se principalmente no linfoma de células do manto; também na leucemia promielocítica, linfoma esplênico; raro em leucemia linfocítica crônica, mieloma múltipla.

RESULTADO DA ANOMALIA CROMOSSÔMICA: 5' BCL1 translocado no cromossomo 14 cerca de JH (IgH) e C em 3'.

PROTEÍNA ANORMAL: Não existe proteína de fusão, mas troca de promotor; o enhancer do gene da imunoglobulina estimula a expressão de bcl-1. Esta expressão acelera o trânsito celular na fase G1.

DIAGNÓSTICO: A detecção se faz mediante Nested PCR.

O teste é indicado para determinar a presença ou ausência de rearranjo no gene BCL1 em casos recentemente diagnosticados de linfoma de células do manto, linfomas não classificados ou para monitorização de doença residual mínima. É realizada a pesquisa para fusões IgH/BCL1, presentes na maior região MCL2. Um resultado positivo indica a presença de translocação cromossomal bcl-1/JH t(11;14). Um resultado negativo não exclui completamente a presença desta translocação.

MÉTODO

Reação em cadeia da Polimerase

CONDIÇÃO

Medula Óssea ou Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

14 dias úteis

Rearranjo BCL2/JH t(14,18)

BCL2 apresenta 25 kDa; 205 aminoácidos (BCL2b) ou 239 aminoácidos (BCL2a que tem, além disso, uma terminação hidrofóbica aderida a membrana. Esta terminação tem atividade anti-apoptótica. Contém domínios BH (homo/heterodimerização) e NH.

EXPRESSÃO: ampla; em B e T em particular.

LOCALIZAÇÃO: Principalmente em membrana mitocondrial.

FUNÇÃO: antiapoptoses, mediante um processo complexo; dimerização com BAX; papel antiapoptótico formando complexos com caspase-9 e APAF1, prevenindo o metabolismo de proteases (através de ativação dependente de caspase-3 citocromo C).

ENTIDADE: t(14;18)(q32;q21)/B-cell . IgH - BCL2

PATOLOGIA: B-cell NHL principalmente;

INCIDÊNCIA: Encontra-se em 80% - 90 % de linfomas foliculares, 30% de linfomas de células grandes difusas.

RESULTADO DA ANOMALIA CROMOSSÔMICA: 5' BCL2 se transloca no cromossomo 14 cerca de JH (IgH) e C em 3'.

PROTEÍNA ANORMAL: Não existe proteína de fusão, mas troca de promotor; o enhancer do gene da imunoglobulina estimula a expressão de BCL-2. Como BCL-2 é um

inibidor apoptótico, há um atraso na morte celular e há um acúmulo celular.

O exame genético é empregado para detecção molecular da alteração cromossômica ocasionada pela t(14;18) (q32;q21), que caracteriza 90% dos casos de linfoma folicular. O resultado da translocação é a transformação maligna das células afetadas e consequente alteração da expressão gênica do BCL2, o que favorece a proliferação das células linfóides em relação as células normais.

O rearranjo de BCL-2 é indicado para o diagnóstico de linfomas difusos de células grandes e investigação e monitorização de Doença Residual Mínima (DRM) durante e ao final do tratamento.

MÉTODO

Reação em cadeia da Polimerase NESTED

CONDIÇÃO

- Medula Óssea ou Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

14 dias úteis

14



Rearranjo BCL6

PATOLOGIA: O maior número de translocações que afetam o gene BCL-6 são encontrados nos linfomas B não-Hodgkin

INCIDÊNCIA: Detecta-se de 15%-40% dos casos em linfomas de células B grandes (DLBCL), 6%-15% de linfomas foliculares e 50% dos casos de linfomas de Hodgkin nodulares.

EXPRESSÃO: Na linha germinal de células B e T, outros tecidos linfóides, células musculares e queratinócitos.

LOCALIZAÇÃO: Nuclear.

FUNÇÃO: A proteína se une a uma sequência específica de DNA e reprime sua transcrição. A união do DNA é mediada através da sequência TTCCT(A/C)GAA enquanto as interações proteína-proteína se realizam mediante domínios BTB/POZ inter-atuando com outras proteínas através de dedos de zinco (incluindo *Histone Deacetylase 1* (HDAC1) e *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor 1* (SMRT1)). O extremo carboxi-terminal, por outra parte, é responsável pela união específica do DNA através de seus 6 dedos de zinco.

ENTIDADE: 3q27 /NHL (non Hodgkin linfomas).

CILOGENÉTICA: Os reordenamentos em 3q27 são diversos e incluem microdeleções, mutações pontuais e hipermutação. Em 50% destas translocações, são afetados os genes Ig em 14q32 (IgH), 2p12 (IgK) e 22q12 (IgL) (e.g. t(3;14)(q27;q32)). Menos da metade afetam a outras regiões cromossômicas (1q21, 2q21, 4p11, 5q31, 6p21, 7p12,

8q24, 9p13, 11q13, 11q23, 12q11, 13q14-21, 14q11, 15q21; 16p11...). Além dessas, há alterações bialélicas.

Resultado da Anomalia Cromossômica: A substituição de promotor entre BCL-6 e suas diferentes partes dão lugar a transcritos quiméricos com um extremo 5' do gene participante fusionado ao local de splice do éxon 2 do BCL-6. Em alguns casos é possível encontrar quimeras recíprocas com a região reguladora 5' do BCL-6 fusionada com região codificante do gene partner.

O gene BCL6, altamente expresso em células germinativas tipo B, desempenha uma função central na modulação da transcrição dos genes envolvidos na ativação linfocítica, ciclo celular, apoptose e diferenciação. Expressão alterada de BCL6 em células B germinativas tem função oncogênica, provavelmente por inibir a apoptose e aumentar a proliferação celular. São conhecidas mutações na região 5' não codificante, relacionadas a estes eventos.

MÉTODO

Reação em cadeia da Polimerase MULTIPLEX

CONDIÇÃO

Medula Óssea ou Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

30 dias úteis

RET- Sequenciamento do Protooncogene RET: exons 10, 11, 13, 14, 15 e 16 individualizados

A recomendação da análise genética do protooncogene RET deve ser feita a todos indivíduos afetados pelo carcinoma medular. Uma vez detectada uma mutação específica para uma determinada família, é recomendada o *screening* molecular desta alteração genética nos ascendentes e descendentes diretos do indivíduo portador. Isso permite a identificação de portadores de mutações no proto-oncogene RET, previamente ao início da sintomatologia e da morbidade e relacionadas. Geralmente, o prognóstico de pacientes NEM 2 é melhor quando o diagnóstico é precoce e há intervenção terapêutica em tempo hábil.

Visando maior acesso da população à avaliação genética, disponibilizamos o sequenciamento de cada exon de forma individualizada, o que reduz o custo para os des-

cententes e ascendentes dos afetados. Recomenda-se enviar o resultado da análise genética do RET do indivíduo portador já genotipado.

MÉTODO

PCR e sequenciamento

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

30 dias úteis

15

Retinoblastoma - Estudo molecular do gene RB1

O retinoblastoma é um tumor maligno que se desenvolve na retina e ocorre antes dos 5 anos. O retinoblastoma pode ser unifocal ou multifocal, cerca de 60% dos afetados apresentam a forma unilateral com uma idade ao diagnóstico de 24 meses e 40% tem um retinoblastoma bilateral realizando o diagnóstico com 15 meses de idade. A identificação de mutações pontuais ocorre em 70% dos casos ao se realizar a sequenciamento do gene RB1.

LOCALIZAÇÃO: 13q14.1-q14.2

HEREDITARIEDADE: autossômica dominante

INCIDÊNCIA: 1:15,000 - 20,000

MÉTODO

PCR e sequenciamento/*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-MLPA*

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

22 dias úteis

Translocação BCR-ABL - Qualitativo

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é a doença mieloproliferativa mais comum, representando cerca de 20% a 25 % de todos os casos de leucemia e cerca de 3% das leucemias infantis, sendo que sua incidência é de 1 caso a cada 100.000 pessoas em países ocidentais. Acomete principalmente indivíduos entre 45 e 55 anos, sendo que 30% dos pacientes diagnosticados têm mais de 60 anos.

MÉTODO

Reação em Cadeia da Polimerase Reversa (RT-PCR)

CONDIÇÃO

Sangue de Medula Óssea em EDTA ou Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar refrigerado entre 2° e 8°C em até 2 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

10 dias úteis.

UGT1A1, polimorfismo do gene - Toxicidade do irinotecan

O irinotecan, um inibidor de topoisomerase I, apresenta função antineoplásica. É indicado como terapia para pacientes com carcinoma metastásico de colón ou reto, com recorrência ou progressão destes e com câncer de colón metastásico avançado. Seu metabolismo envolve numerosas enzimas, garantindo que a forma ativa, SN-38, sofra eficaz eliminação biliar ao se transformar em SN-38G, a forma inativa. No entanto, muitos estudos indicam que é comum a ocorrência de neutropenia e diarreia, até mesmo em 8 horas após a administração.

MÉTODO

PCR-STR Fluorescente e genotipagem em sequenciador automático

CONDIÇÃO

Sangue Total em EDTA.

CONSERVAÇÃO PARA ENVIO

Enviar em temperatura ambiente até 2 dias ou refrigerado entre 2° e 8°C em até 7 dias.

TEMPO DE LIBERAÇÃO

15 dias úteis

16

