

# Abordagens citogenéticas moleculares modernas revelando a duplicação da fusão reversa *MLL3-KMT2A* e do oncogene *GAS6*: Um caso raro de LMA pediátrica

Roberto Capela (DO)<sup>1,2</sup>, Elaine Cifoni<sup>1</sup>, Daniela Ribeiro Ney Garcia<sup>1,3</sup>, Moneeb Othman<sup>4</sup>, Amanda Faria de Figueiredo<sup>1</sup>, Thomas Liehr<sup>4</sup>, Gerson Moura Ferreira<sup>5</sup>, Raul C. Ribeiro<sup>6</sup>, Maria Luiza Macedo Silva<sup>1,2,3</sup>

1. Laboratório de Citogenética, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 2. Programa de Pós-graduação do INCA em Oncologia; 3. Programa de pós graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 4. Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany; 5. Laboratório de Células-tronco, Centro de Transplante de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 6. Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA.

## INTRODUÇÃO

A Leucemia mieloide aguda (LMA) pediátrica é uma doença altamente heterogênea que apresenta cariótipos específicos e anormalidades moleculares como fatores prognósticos determinantes. Portanto, a citogenética ainda é considerada padrão ouro para compreensão das causas dos rearranjos cromossômicos, e mecanismos subjacentes à transformação leucêmica.

Alterações numéricas, resultando em alterações de ploidia, como ganhos ou perdas cromossômicas, devem ser igualmente notadas como fatores prognósticos importantes nas Leucemias da infância. A hiperdiploidia na LMA é rara, acometendo 1-2% dos pacientes pediátricos. Além disso, a incidência em pacientes com menos de 12 meses de idade é extremamente rara, não apresentando um prognóstico estabelecido.

Normalmente, cariótipos hiperdiploides na LMA são caracterizados por anormalidades cromossômicas específicas associadas a um mau prognóstico; -5, -7, del(5q), del(7q) e rearranjos do gene *KMT2A*, além de serem usualmente apresentadas no contexto de um cariótipo complexo. Estes cariótipos são ligeiramente mais frequentes na LMA subtipo FAB M7, e as anormalidades mais comumente observadas são trissomias dos cromossomos 6, 8, 10, 19 e 21.

Recentes trabalhos têm sugerido uma correlação entre as anormalidades detectadas em um cariótipo complexo e a resposta clínica, portanto, fica clara a necessidade de um refinamento deste perfil cariotípico.

## OBJETIVO

Neste projeto de doutorado, objetivamos detectar e caracterizar cariótipos complexos através da combinação de técnicas de citogenética convencional e abordagens moleculares, para uma melhor definição e compreensão do seu papel biológico na LMA pediátrica.

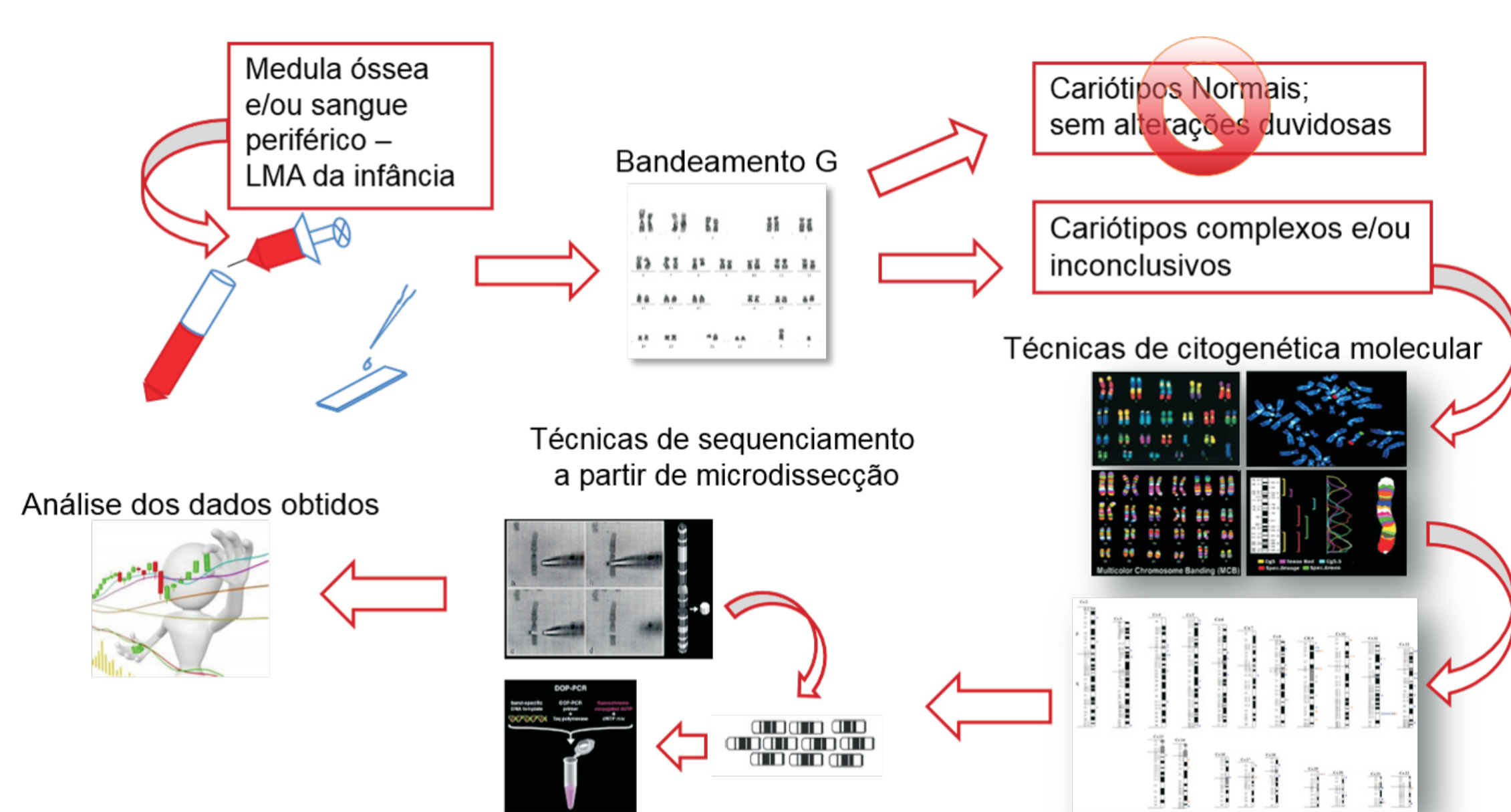
Neste sentido, nós descrevemos um caso raro de LMA da infância, apresentando um cariótipo complexo original com hiperdiploidia e o envolvimento do gene *KMT2A* em duas fusões reversas *MLL3-KMT2A* e a duplicação do gene *GAS6* em um bebê com LMA subtipo FAB-M5a.

## RELATO DE CASO

Uma menina de 7 meses de idade, foi internada no Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Brasil, com o histórico de uma semana de febre, diarreia grave, irritabilidade, palidez e hepatoesplenomegalia. Hemoglobina 7,4 g/dL, contagem leucocitária 22.000 e plaquetas 64.000. No diagnóstico, sua medula óssea era hiperclular com 83% de blastos, sendo 40% monoblastos. A imunofenotipagem revelou blastos positivos para CD4, CD15, CD33, CD36, CD45, CD64, proteína 7.1(NG2) e MPO++, portanto compatível com LMA-M5a.

A bebê foi tratada com o protocolo BFM 2004 e apresentou uma evolução favorável remetindo no D-15, e permanecendo em remissão completa por 8 meses, até o momento.

## DESENHO EXPERIMENTAL



\*Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do INCA (#088/07).

## METODOLOGIA E RESULTADOS

### Citogenética Clássica

A análise citogenética foi realizada ao diagnóstico antes da administração do tratamento, em células de medula óssea, cultivadas por 24 horas, de acordo com o protocolo padrão.

### Citogenética Molecular

Os experimentos baseados em hibridização *in situ* por fluorescência foram conduzidos utilizando ambos tipos de sondas, caseiras e comerciais, de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes.

### Resultados

Curiosamente os resultados demonstraram 3 sinais de rearranjo do gene *KMT2A* (Fig. 1A). A análise por Bandejamento G mostrou hiperdiploidia, mas os cromossomos supranumerários e as anormalidades estruturais foram inconclusivos. Deste modo, nós conduzimos estudos citogenéticos moleculares por Multiplex-FISH (M-FISH) (Fig. 1B), pintura cromossômica parcial (Fig. 1C) e Multicolor Chromosome Banding (MCB) (Fig. 1D), revelando o cariótipo final:

**53,XX,+X,+6,t(9;11)(p21.3;q23.3),+der(9)t(9;11)(p21.3;q23.3),dup(13)(q31q34),+14,+19,+21,+22[6].**

A análise citogenética molecular dos cromossomos levantou a suspeita de uma duplicação na região 13q34. Assim, a fim de confirmar e refinar o cariótipo, nós pensamos no gene *GAS6*, uma vez que este gene é mapeado exatamente nesta região cromossômica. Surpreendentemente, os nossos resultados mostraram dois sinais do genes *GAS6* (Fig. 1E).

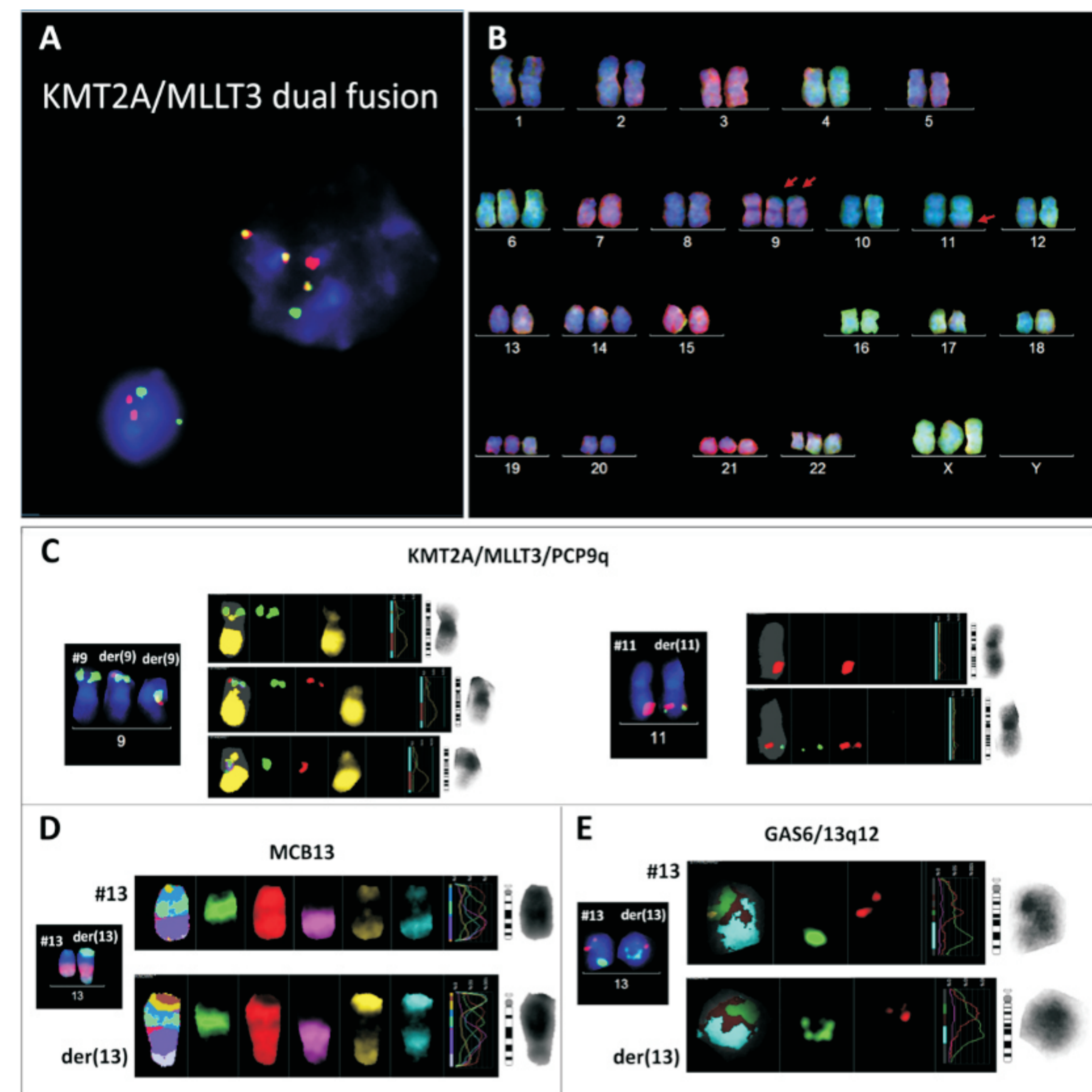


Fig. 1A. FISH em núcleo mostrando um núcleo normal e o núcleo alterado com 3 sinais de fusão do gene *KMT2A*; 1B. Cariótipo por M-FISH. As setas vermelhas apontam os rearranjos do gene *KMT2A* e consequentemente a duplicação da fusão reversa *MLL3-KMT2A*. 1C. Análise por FISH dos cromossomos 9 e 11 com a combinação das sondas de pintura cromossômica parcial 9q (amarelo) e da LSI *KMT2A/MLL3* dual fusion mostrando sinais normais do gene *KMT2A* (vermelho), *MLL3* (verde), e uma cópia extra da fusão *KMT2A/MLL3* (amarelo). 1D. Análise por MCB do cromossomo 13 mostrando a duplicação da região 13q31-34. 1E. Análise por FISH do gene *GAS6* (verde) com o controle sub-centromérico 13q12 (vermelho). A análise revelou que o gene *GAS6*, mapeado na região 13q34 apresentou 2 cópias no der(13).

## DISCUSSÃO

O gene *GAS6* é descrito como um regulador negativo da via de coagulação. Em LMA citogeneticamente normal, *GAS6* é relacionado com um mau prognóstico em adultos, devido à ativação de AXL, bem como outros membros desta família de receptores como *TYRO3* e *MERTK*, que em conjunto são associados a agressividade e quimioresistência. Uma vez que é a primeira vez que este gene está sendo descrito duplicado na leucemia infantil, as implicações da desregulamentação do *GAS6* na LMA pediátrica ainda precisam ser determinadas.

A fusão *KMT2A-MLL3* tem função de transcrição que atua dentro de um complexo, levando à ativação desregulada de genes-alvo *HOX* leucêmicos. Apesar de mais de 100 fusões recíprocas terem sido caracterizadas ao nível molecular, pouco ainda é conhecido sobre suas funções. Recentemente foi reportado que *AF4-KMT2A* e algumas outras fusões reversas apresentaram efeitos oncogênicos *in vitro*. A duplicação da fusão reversa *MLL3-KMT2A* é rara, já que apenas um outro caso foi encontrado na literatura em na AML da infância. Deste modo, os efeitos clínicos e oncogênicos da superexpressão da fusão *MLL3-KMT2A*, ainda precisam ser investigados.

Recentes trabalhos na literatura mostraram que a hiperdiploidia não deve ser considerado automaticamente como um grupo de risco citogenético adverso. Em vez disso, o valor prognóstico da hiperdiploidia deve ser avaliada com base nas alterações específicas, associadas a um prognóstico adverso, corroborando com o trabalho apresentado.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, nós contribuimos para o registro e biologia dos cariótipos hiperdiploides na LMA pediátrica:

Para nosso conhecimento, este é o primeiro caso que mostra um cariótipo complexo hiperdiploide com duplicações da fusão reversa *MLL3-KMT2A* e do oncogene *GAS6* em uma criança com menos de 12 meses de idade;

Reforçamos que a diversidade e flexibilidade de abordagens de citogenética molecular são cruciais para determinar as implicações clínicas de cariótipos complexos;

FISH, M-FISH e MCB, são ferramentas padrão ouro para caracterizar a heterogeneidade da Leucemia aguda do lactente.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos médicos colaboradores de nosso projeto, e em especial à Dra. Edna Carboni por fornecer a amostra para este trabalho.

Este trabalho foi financiado por: Stefan Morsch Stiftung e Monika Kutzner Stiftung (Germany), German CAPES (PROBRAL/DAAD No. 419/14), FAPERJ (project No. E-26/110: 868/2013), INCT Para o Controle do Câncer, the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC), St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tenn., USA) e pelo Center of Excellence Grant, Tenn., USA.