

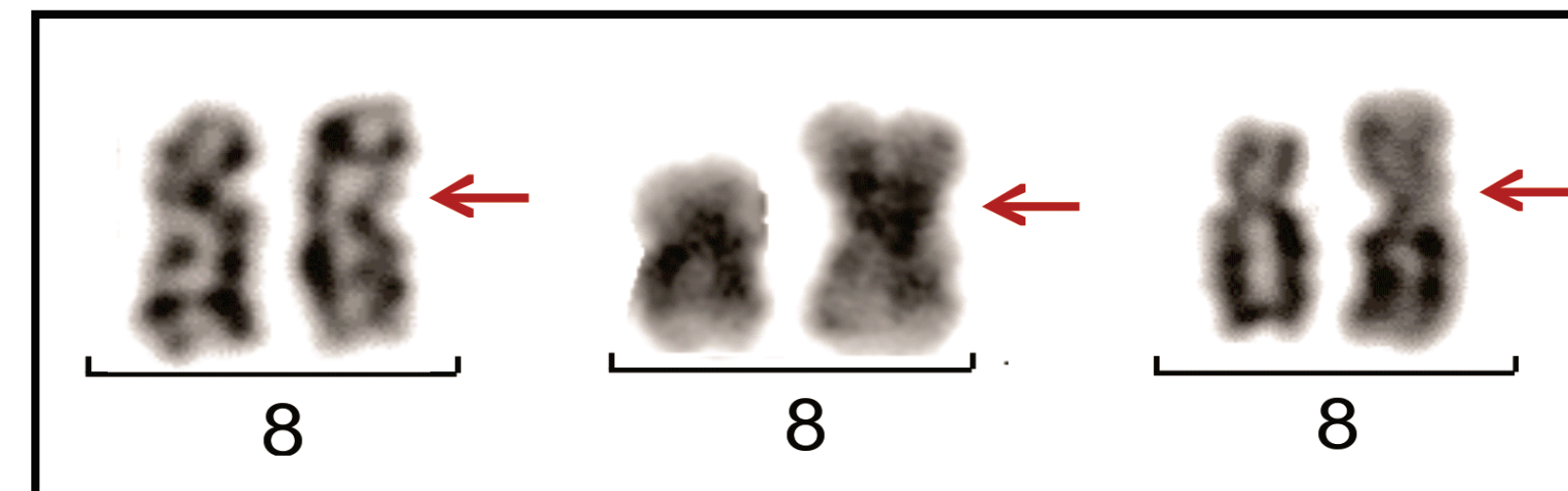
# Perfil molecular do Linfoma de Burkitt com um isocromossomo i(8)(q10) como única anormalidade citogenética em um paciente pediátrico com ataxia-telangiectasia

Mariana T De Souza<sup>a,b</sup>, Gabriela Vera-Lozada<sup>b,c</sup>, Teresinha J Marques-Salles<sup>d</sup>, Luciana W Pinto<sup>e</sup>, Soraia Rouxinf, Thomas Liehr<sup>g</sup>, Raul C Ribeiro<sup>h</sup>, Rocio Hassan<sup>b,c</sup> & Maria L M Silva<sup>a,b</sup>

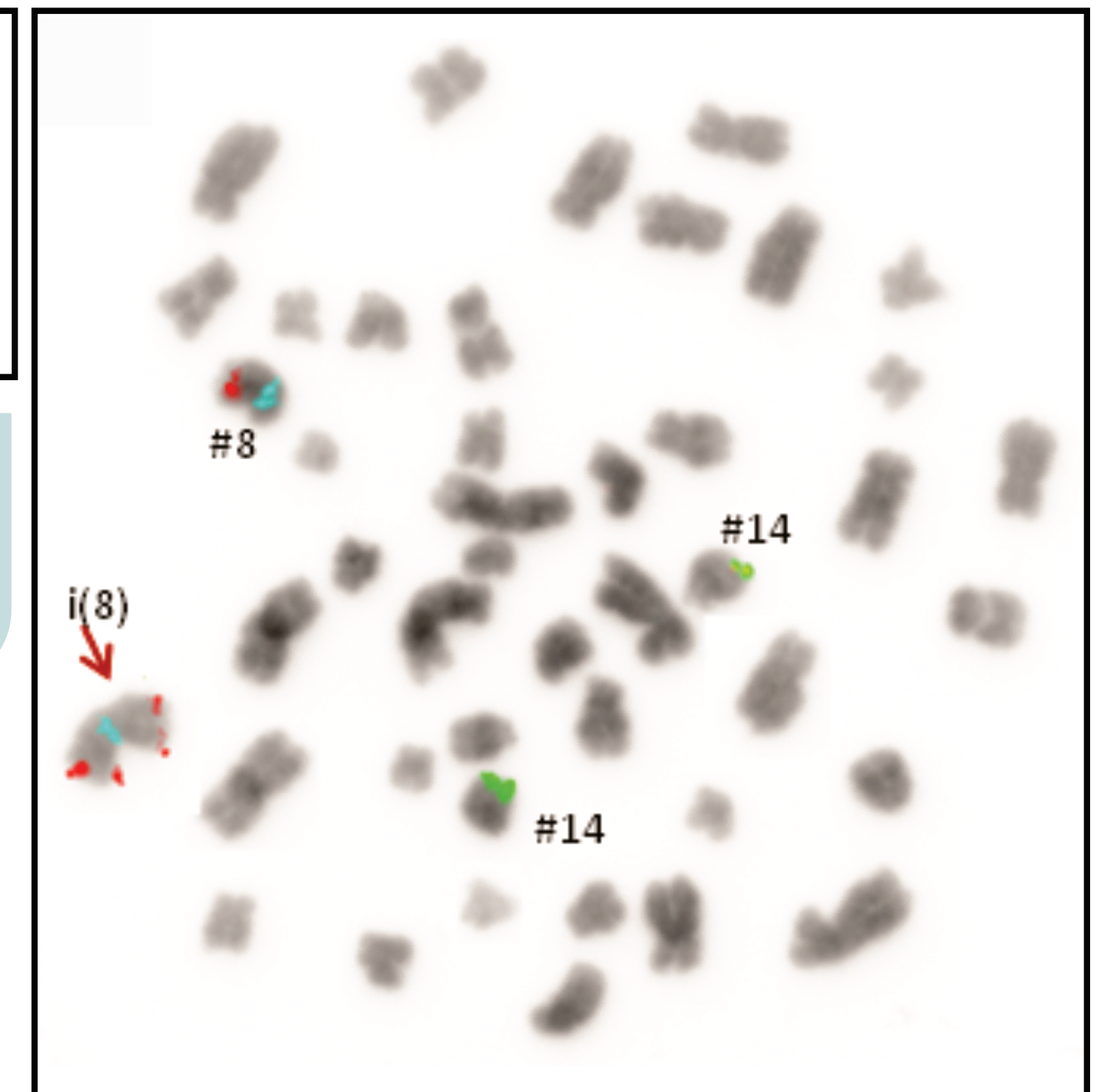
<sup>a</sup>Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>b</sup>Programa de Pós Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>c</sup>Laboratório de Oncovirologia, Centro de Estudos de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>d</sup>Departamento de Genética, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>e</sup>Departamento Integrado de Patologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>f</sup>Departamento de Hematologia Pediátrica, Hospital Federal da Lagoa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>g</sup>Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Jena, TH, Germany; <sup>h</sup>Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

## INTRODUÇÃO

O Linfoma/Leucemia de Burkitt (L/LB) foi a primeira neoplasia a ser associada com o rearranjo do oncogene *MYC*, que é o *hallmark* molecular desta doença. Por muito tempo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o L/LB com base na presença do rearranjo do *MYC* com um dos genes de imunoglobulina, o *IGH* (14q32) no lócus de cadeia pesada ou os *loci* de cadeia leve, *IGK* (2p12) ou *IGL* (22q11). No entanto, atualmente classificação da OMS, considera 10% de casos de L/LB sem uma translocação envolvendo o oncogene *MYC* (Swerdlow *et al.*, 2008; Said *et al.*, 2014). Durante um estudo do nosso grupo sobre o significado clínico das anormalidades cromossômicas secundárias no L/LB da infância (De Souza *et al.*, 2014), identificamos um paciente com ataxia-telangiectasia (AT) diagnosticado morfológica e imunofenotipicamente e tratado para L/LB, sem rearranjo do *MYC*, mas com um isocromossomo 8 (cariótipo: 46,XY,i(8)(q10)) e três cópias deste gene, demonstradas por Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de expressão de *MYC*, bem como outros genes e microRNAs que caracterizam a assinatura molecular do L/LB em nosso paciente para testar a hipótese de que se trataria de um LB atípico sem *MYC* translocado.



**Figura 1:** Citogenética convencional por Bandamento G: Cariótipo parcial ilustrando o isocromossomo 8 (indicado pela seta vermelha).



**Figura 2:** Análise por FISH usando a sonda *IGH* / *MYC* / *CEP8* Tri-Color Dual Fusion (Abbott Molecular). Sinal verde: *IGH*; Sinal vermelho: *MYC*; Sinal azul: *CEP8*. A seta vermelha mostra o isocromossomo 8 com duas cópias do *MYC*, somando o total de 3 por célula.

## METODOLOGIA

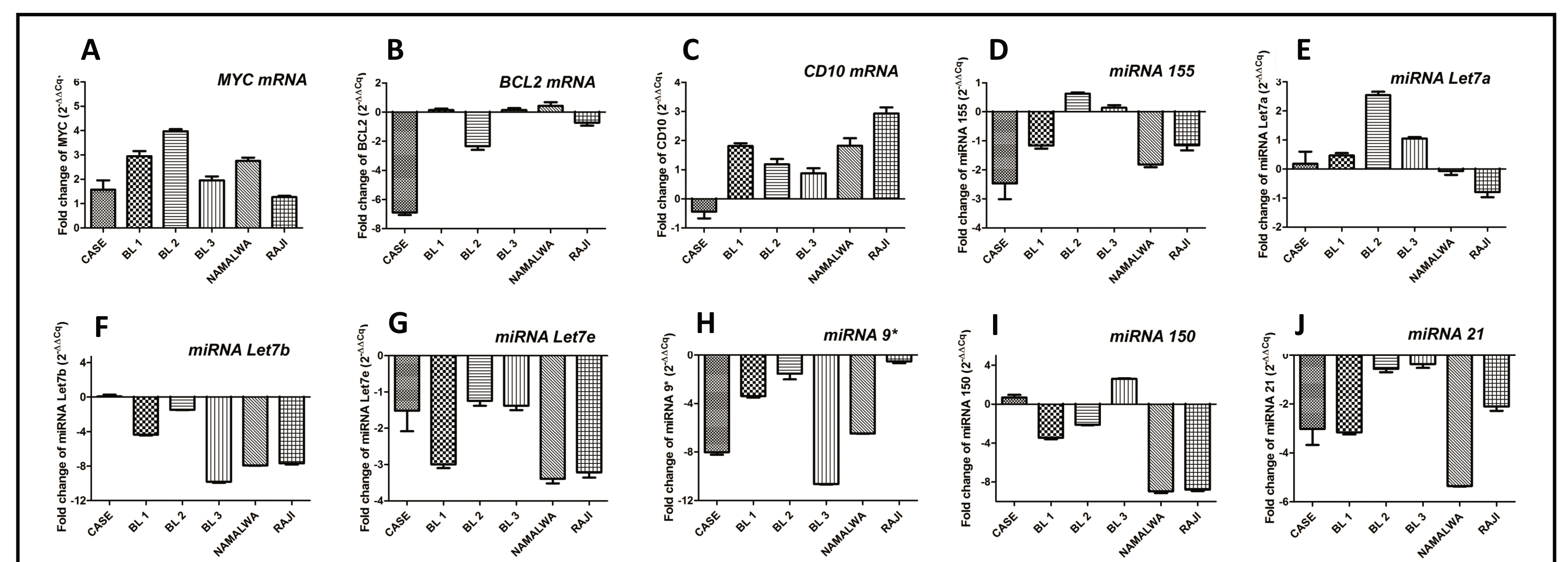
**Relato de Caso:** Criança, do sexo masculino, 7 anos de idade, diagnosticada com AT aos 18 meses de idade, admitida no Hospital Federal da Lagoa com hepatoesplenomegalia, 4 meses de febre e emagrecimento e 30 dias de diarreia. No exame físico foi observada uma massa de aproximadamente 6cm e hepatomegalia (3cm). Os exames laboratoriais mostraram: contagem leucocitária (6,15x10<sup>9</sup>/L) e plaquetária (534 x10<sup>9</sup>/L). O nível de LDH medido no sangue foi 2.378 U/l. A avaliação morfológica da medula óssea mostrou hiperplasticidade com 92% células blásticas de origem linfóide vacuoladas, citoplasma basofílico, compatível com L/LB. A citometria de fluxo revelou uma população de blastos que expressava HLA-Dr, CD19, CD20, CD22, CD45, CD38, CD79b, sIgκ, cCD79a e IgM. A criança foi tratada de acordo com o protocolo BFM-95 para estágio IV de LB e recaiu precocemente, indo a óbito. O cariótipo por bandamento G das células da medula óssea do paciente possuíam um clone 46,XY,i(8)(q10) (Figura 1). A análise por FISH utilizando a sonda *IGH*/*MYC*/*CEP8* Tri-Color Dual-Fusion (Abbott Molecular) revelou 3 sinais vermelhos, 2 dos quais em um cromossomo derivativo 8, caracterizando molecularmente um isocromossomo 8. Um cromossomo 8 normal estava presente, de modo que o cariótipo final ficou caracterizado como 46,XY,i(8)(q10).ish 8q24(MYCx3) (Figura 2).

Amostras tumorais embebidas em formalina e incluídas em parafina (FFPE) de 3 pacientes com L/LB e a t(8;14)(q24;q32) e células de 2 linhagens celulares (Raji e Namalwa). Foram usadas para comparação através da técnica de RT-PCR. O RNA foi extraído de amostras em FFPE dos pacientes com L/LB e da biópsia de medula óssea do paciente em questão usando o kit MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre). A quantificação relativa dos genes celulares foi testada através de ensaios TaqMan® para CD10, BCL2, ACTB, e B2M (Vera-Lozada *et al.*, 2014) e utilizando a metodologia SYBRgreen® para os genes *MYC*, *ACTB* e *GUSB*, para os quais o cDNA foi previamente amplificado utilizando PreAmp Master Mix (SABiosciences). Para a quantificação relativa dos miRNAs, o cDNA foi sintetizado a partir de 30 ng do RNA total, usando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) para cada miRNA e o gene de referência RNU48. A normalização foi obtida com a média dos genes de referência ou com o RNA pequeno RNU48 para a expressão de miRNAs.

## RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os níveis de expressão de *MYC* e *BCL2* no nosso paciente foram semelhantes aos níveis do grupo de L/LB controle, enquanto que os níveis de CD10 foram menores do que aqueles para o grupo de L/LB. No que diz respeito à expressão dos miRNAs, níveis de miR155 e Let7a, b, e e, os quais são conhecidos por serem regulados negativamente por *MYC*, foram, em geral, baixos no grupo de L/LB. O miR9\*, que é regulado negativamente em pacientes que não possuem a translocação do *MYC*, foi regulado negativamente no nosso paciente, bem como no grupo de L/LB. Os miR150 e miR21 foram regulados negativamente em todos os casos (Figura 3).

Assim, a análise da expressão no nosso paciente sugere um perfil molecular de L/LB apesar da falta de um *MYC* translocado. A literatura tem sugerido que casos de LB sem o rearranjo do *MYC* podem apresentar mecanismos patogênicos alternativos, tais como a desregulação através de miRNAs. No nosso caso, ainda precisa ser elucidado se a expressão alterada de *MYC* resultou da desregulação por microRNAs ou da trissomia do 8, que poderia levar a uma superexpressão do gene devido a uma dosagem aumentada do mesmo.



**Figura 3:** Comparação da expressão de genes e microRNA (miRNA) em amostras de tumor do paciente do estudo com outros do grupo de LB e linhagens celulares derivadas de LB. A: *MYC*; B: *BCL2*; C: *CD10*; D: miR-155; E: miR-Let7a; F: miR-Let7b; G: miR-Let7e; H: miR-9\*; I: miR-150; J: miR-21.

## BIBLIOGRAFIA

- Swerdlow S, Campo E, Harris NL, *et al.* WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
- Said J, Lones M, Yea S. Burkitt lymphoma and *MYC*: What else is new? *Adv Anat Pathol.* 2014; 21(3):160-165.
- De Souza MT, Hassan R, Liehr T *et al.* Conventional and molecular cytogenetic characterization of Burkitt lymphoma with bone marrow involvement in Brazilian children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer.* 2014; 61(8):1422-1469.
- Vera-Lozada G, Scholl V, Barros MH *et al.* Analysis of biological and technical variability in gene expression assays from formalin-fixed paraffin-embedded classical Hodgkin lymphomas. *Exp Mol Pathol.* 2014; 97:433-439.

**Apoio:** CAPES – PROBRAL/DAAD (419/14), Ministério da Saúde (MS), FAPERJ (214133), FAPERJ E-26/110.432/2010, Monika Kutzner Stiftung (Alemanha), the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC) e the Center of Excellence Grant from the State of Tennessee (USA).