

Expressão celular do receptor CD44 e a isoforma CD44V6 e sua associação a mutações do gene *RAS* em LLA/LLb-T pediátricas.

Luísa Vieira Codeço Marques, Elda Pereira Noronha, Eugênia Terra Granado Pina, Maria S. Pombo-de-Oliveira.
Programa de Hematologia-Oncologia Pediátrica, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil.

INTRODUÇÃO

As leucemias linfoblásticas agudas de células T (LLA-T) representam 15% dos casos de LLA pediátricas, e são associadas a um pior prognóstico, bem como características clínicas semelhantes ao linfoma linfoblástico de células T (LLb-T). CD44 é uma glicoproteína multifuncional de adesão que ajuda na migração de células precursoras da medula óssea para o timo, no desenvolvimento de linfócitos T. A expressão de CD44 foi associada à progressão tumoral, influenciando na sobrevida e infiltração em órgãos em modelos murinos de LLA-T. O gene *CD44* é um alvo da via de *RAS*, que desencadeia o seu *splicing* alternativo, criando um loop de *feedback* positivo. A variante 6 de CD44 se liga a fatores de crescimento e seus receptores, sustentando assim a sinalização de *RAS*.

OBJETIVO

Correlacionar o perfil de expressão celular de CD44 com isoforma CD44v6, mutações de *N/KRAS* e possíveis associações com o subtipo maturativo, características clínicas e a evolução de LLA/LLb-T pediátricas.

METODOLOGIA

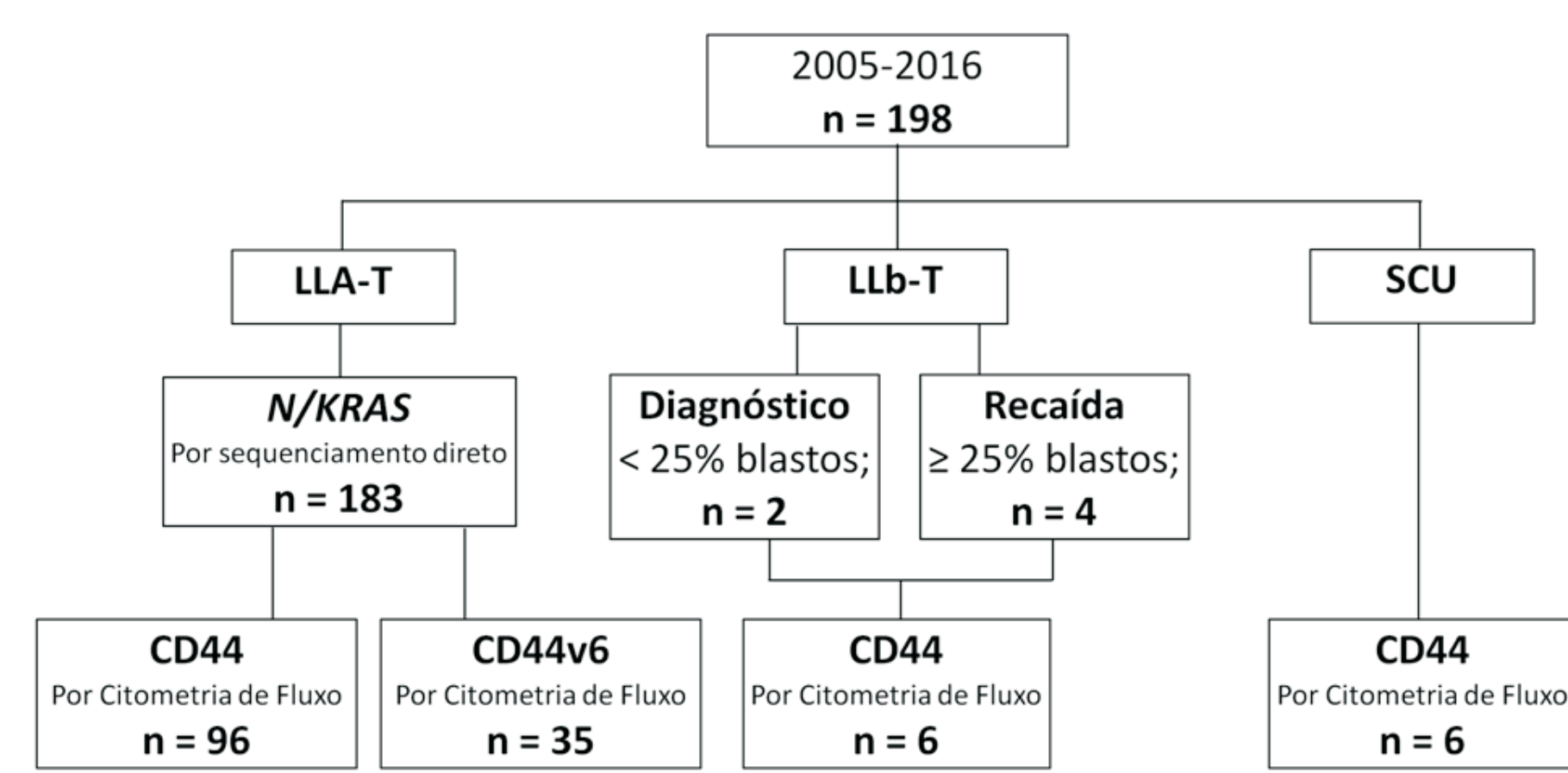


Figura 1. Fluxograma do estudo. LLb-T - Linfoma Linfoblástico de células T; SCU - Sangue de Cordão Umbilical.

O teste χ^2 e o exato de Fisher foram utilizados para comparar a distribuição de variáveis categóricas. Para variáveis contínuas aplicou-se o teste Mann-Whitney (comparação de dois grupos) e o teste de Kruskal-Wallis (comparação de mais de dois grupos). O teste de Spearman foi utilizado para correlacionar variáveis contínuas. O *p*-valor de < 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

O perfil imunofenotípico demonstra que 18 casos de 198 (9,1%) foram LLA de células precursoras T precoces (LLA-ETP), 42 (21,2%) foram pré-T, 75 (37,9%) T cortical e 63 (31,8%) T madura. Dois casos de 96 foram negativos para CD44 ($< 20\%$ blastos positivos). Foi utilizado o valor da IMF no percentil 75 como *cutoff* para discriminar entre os grupos com expressão alta e baixa do CD44 (Figura 1). Linfoblastos de LLA-T (IMF: 2093 [68-18574]) possuem uma menor expressão de CD44 que linfócitos de casos de LLA-T (IMF: 14053 [324-41050]), assim como de SCU (IMF: 9476 [6834-19785]) (Figura 2). Pacientes com leucometria menor que 50000/ μL apresentaram uma maior expressão de CD44 (IMF: 2980 [290-8325]) comparados aos com leucometria maior que 50000/ μL (IMF: 1951 [68-18574]), apesar de não estatisticamente significativa ($p=0,052$) (Figura 3). Não foi observada associação entre a alta expressão de CD44 com a presença de organomegalia (Tabela 1). LLA-ETPs têm uma maior expressão de CD44 (IMF: 3459 [1966-6526]) que os subtipos mais maduros de LLA-T (pré-T: 1632 [68-18574], T cortical: 1976 [290-9518], T madura: 2197 [92-12751]) ($p=0,038$) (Figura 4). Amostras de LLb-T de diagnóstico (IMF: 755 [555-955]) e de recaída (IMF: 1123 [529-1641]) têm menor expressão de CD44 que LLA-T (IMF: 2093 [68-18574]) ($p=0,024$) (Figura 5). Dos 183 *N/KRAS* sequenciados, 16 (8,7%) estavam mutados. Não houve diferença significativa de características clínicas (leucometria e organomegalia), cor da pele, sexo e subtipo de LLA-T de acordo com o status de *N/KRAS*. Pacientes com *N/KRAS* mutado possuem uma maior expressão de CD44 (IMF: 3267 [840-8325]) que casos sem a mutação (IMF: 2069 [194-12750]), porém não estatisticamente significativa ($p=0,068$) (Figura 6). Entre os 35 casos marcados para o CD44v6, apenas 4 apresentaram $>5\%$ blastos positivos (Figura 7). Não foi encontrada correlação entre a expressão de CD44 e de CD44v6 ($r=-0,05$; $p=0,8$) (Figura 8). Não foi encontrada diferença de expressão de CD44v6 entre casos com mutação em *N/KRAS* (IMF: 2 [0-12]) e sem a mutação (IMF: 0 [0-360]) ($p=0,94$) (Figura 9).

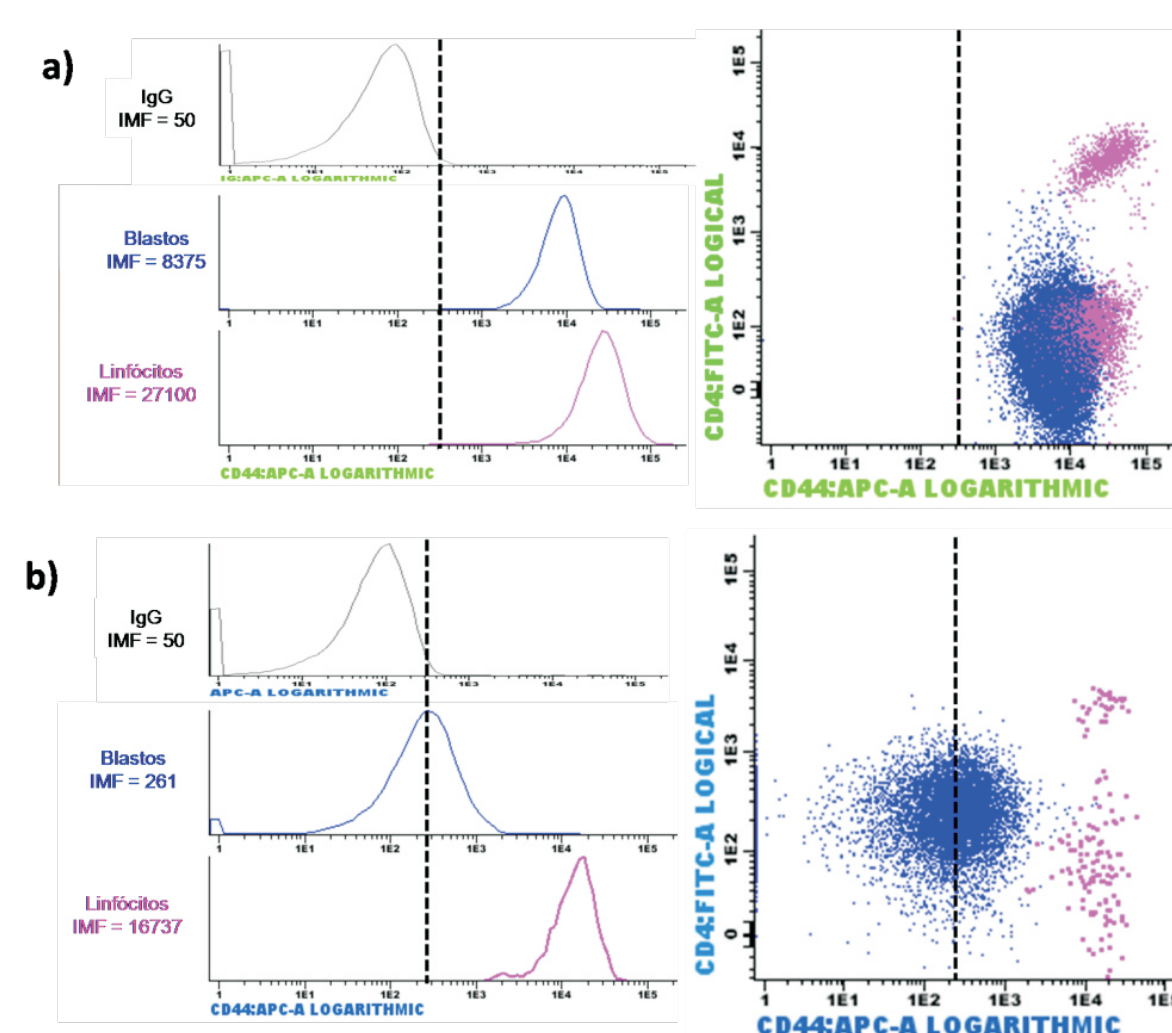


Figura 1. a) Caso com expressão alta de CD44. b) Caso com expressão baixa de CD44.

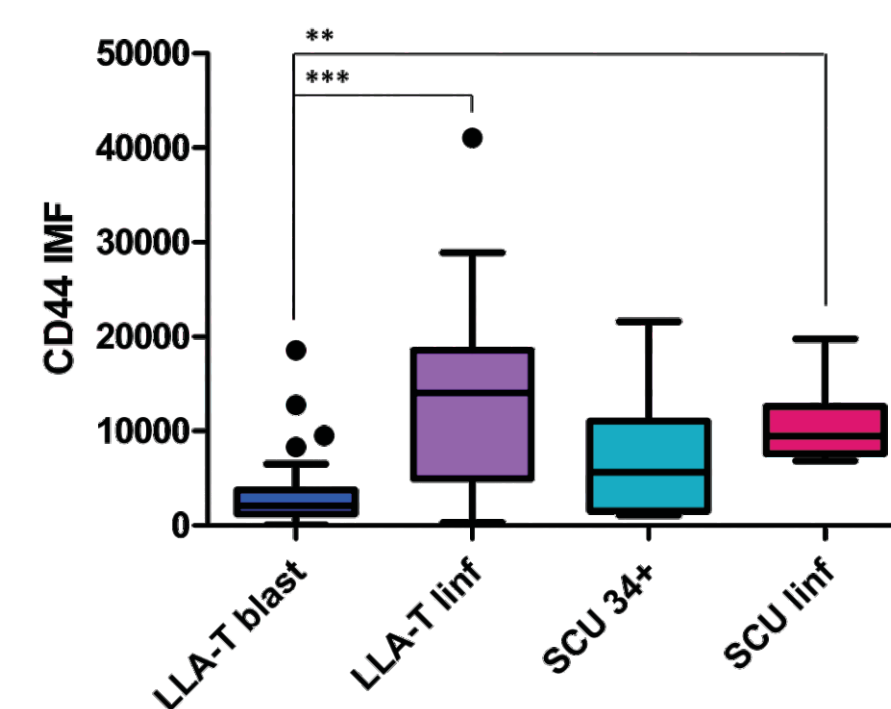


Figura 2. Perfil de expressão de CD44 em linfoblastos de LLA-T, linfócitos de LLA-T, células precursoras CD34 positivas de SCU e linfócitos de SCU. $p < 0,0001$. Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. LLA-T blast - Linfoblastos de LLA-T; linf - linfócitos; SCU - sangue de cordão umbilical; 34+ - células precursoras CD34+.

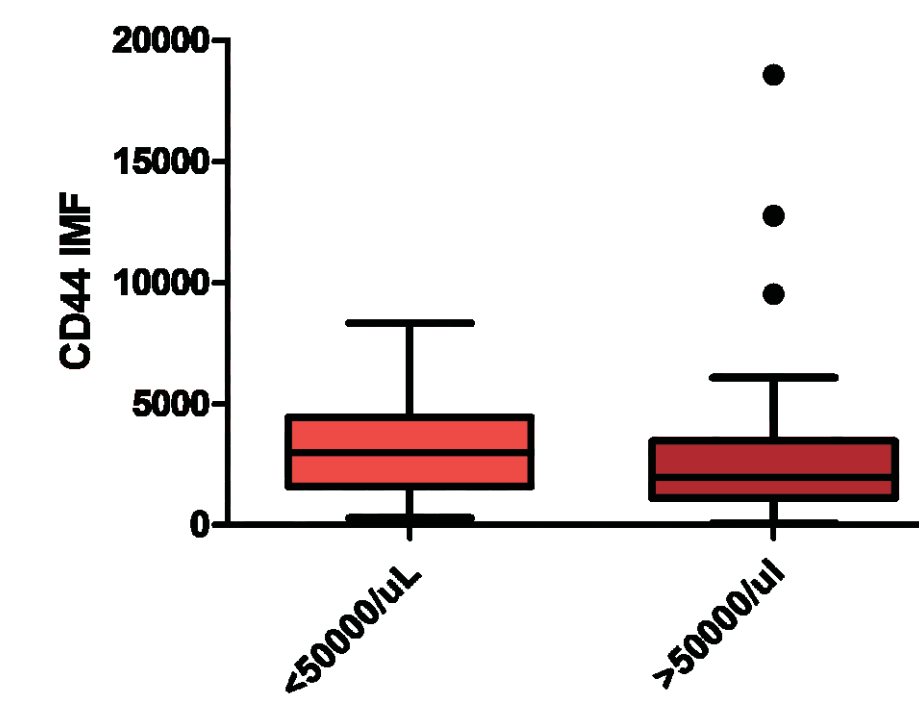


Figura 3. Perfil de expressão de CD44 em linfoblastos de LLA-T com leucometria de 50000/ μL ($n = 22$) e $>50000/\mu\text{L}$ ($n = 74$). $p = 0,052$. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 1. Presença de organomegalia de acordo com o status do CD44

		Intensidade mediana de fluorescência (IMF) de CD44			p
		Total	Baixo	Alto	
Mediastino	Sim	32 (33,7%)	26 (36,1%)	6 (26,1%)	0,5
	Não	63 (66,3%)	46 (63,9%)	17 (73,9%)	
Fígado	Sim	62 (65,3%)	50 (69,4%)	12 (52,2%)	0,1
	Não	33 (34,7%)	22 (30,6%)	11 (47,8%)	
Baço	Sim	69 (72,6%)	52 (72,2%)	17 (73,9%)	1
	Não	26 (27,4%)	20 (27,8%)	6 (26,1%)	
Linfonodos	Sim	64 (67,4%)	49 (68,1%)	15 (65,2%)	0,8
	Não	31 (32,6%)	23 (31,9%)	8 (34,8%)	
Tumoração	Sim	10 (10,5%)	9 (12,5%)	1 (4,3%)	0,4
	Não	85 (89,5%)	63 (87,5%)	22 (95,7%)	
SNC	Sim	4 (4,4%)	4 (5,9%)	0 (0%)	1
	Não	86 (95,6%)	64 (94,1%)	22 (100%)	
Total		95	72 (75,8%)	23 (24,2%)	

p-valor por teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. SNC - Sistema Nervoso Central

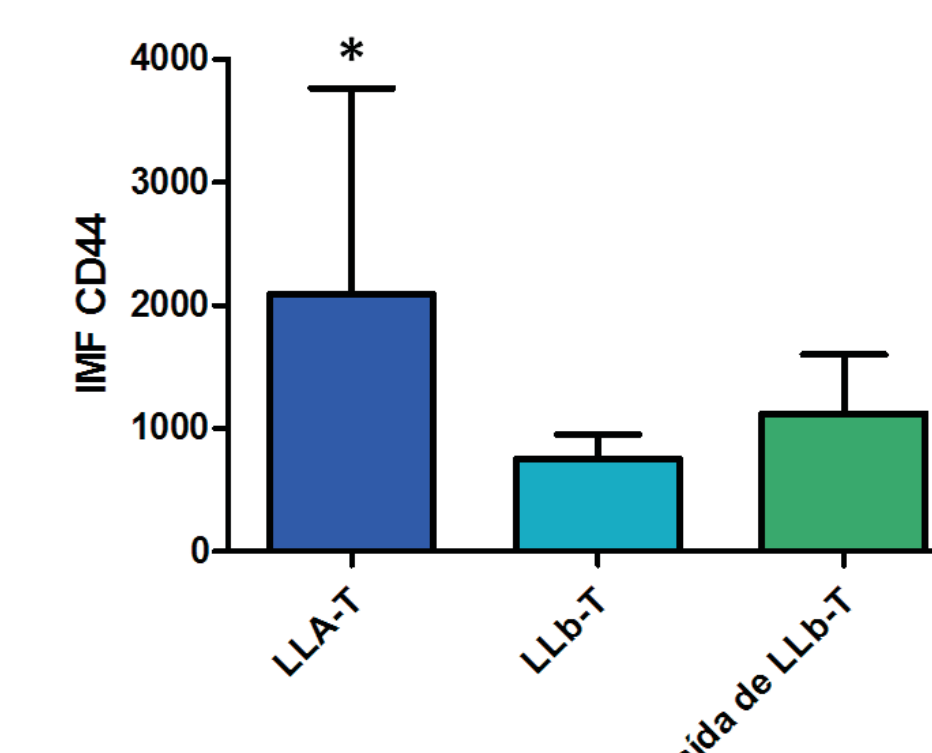


Figura 5. Expressão de CD44 em LLA-T, Linfoma Linfoblástico de Células T (LLb-T) e recaída de LLb-T como LLA-T. LLA-T, $n = 64$; LLb-T, $n = 2$; Recaída de LLb-T, $n = 4$. $p = 0,024$. Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

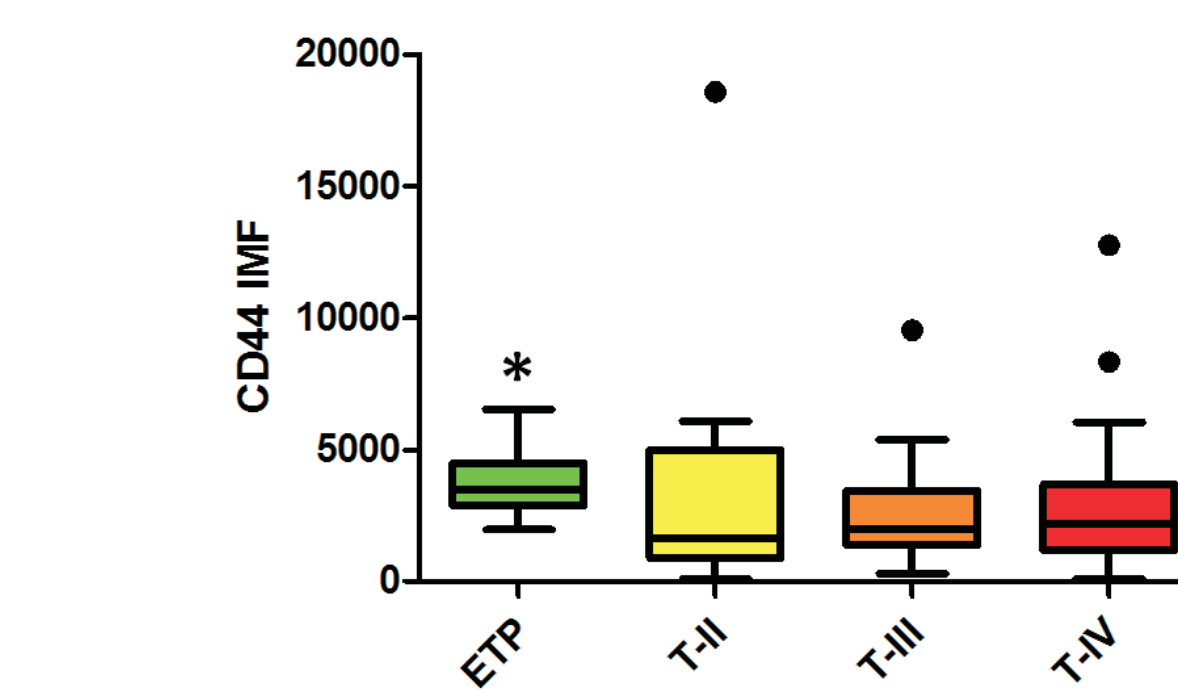


Figura 4. Expressão CD44 de acordo com os subtipos de LLA-T. LLA-ETP (precursores precoces T), $n = 11$; Pré-T, $n = 20$; T cortical, $n = 34$; T madura, $n = 31$. $p = 0,038$. Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Características demográficas, clínicas e subtipos maturativos de acordo com o status do *N/KRAS*.

Variáveis	Total (%)	<i>N/KRAS</i> mutado	<i>N/KRAS</i> selvagem	p	
Idade	< 10 anos	106 (57,9%)	14 (87,5%)	92 (55,1%)	0,015
	10-21 anos	77 (42,1%)	2 (12,5%)	75 (44,9%)	
Sexo	Masculino	142 (77,6%)	15 (93,8%)	127 (76%)	0,127
	Feminino	41 (22,4%)	1 (6,2%)	40 (24%)	
Cor da Pele	Branco	74 (40,7%)	5 (31,3%)	69 (41,6%)	0,595
	Não Branco	108 (59,3%)	11 (68,7%)	97 (58,4%)	
Leucometria	$= 50000/\mu\text{L}$	55 (30,2%)	7 (43,8%)	48 (28,9%)	0,256
	$> 50000/\mu\text{L}$	127 (69,8%)	9 (56,2%)	118 (71,1%)	
Subtipo	ETP	17 (9,3%)	2 (12,5%)	15 (9%)	0,359
	Pré-T	39 (21,3%)	5 (31,3%)	34 (20,4%)	
	T cortical	72 (39,3%)	3 (18,7%)	69 (41,3%)	
	T madura	55 (30,1%)	6 (37,5%)	49 (29,3%)	
	Total	183	16 (8,7%)	167 (91,3%)	

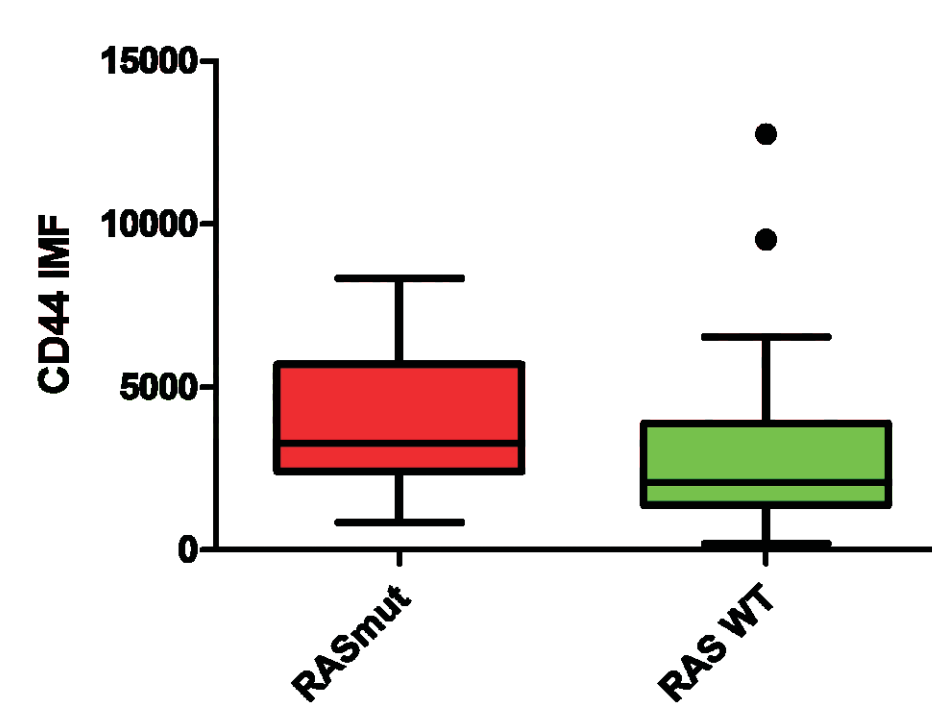


Figura 6. Expressão de CD44 de acordo com status do *RAS*. *N/KRAS* mut, $n = 10$; *N/KRAS* WT, $n = 71$. $p = 0,068$. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney. mut - mutado; WT - selvagem.

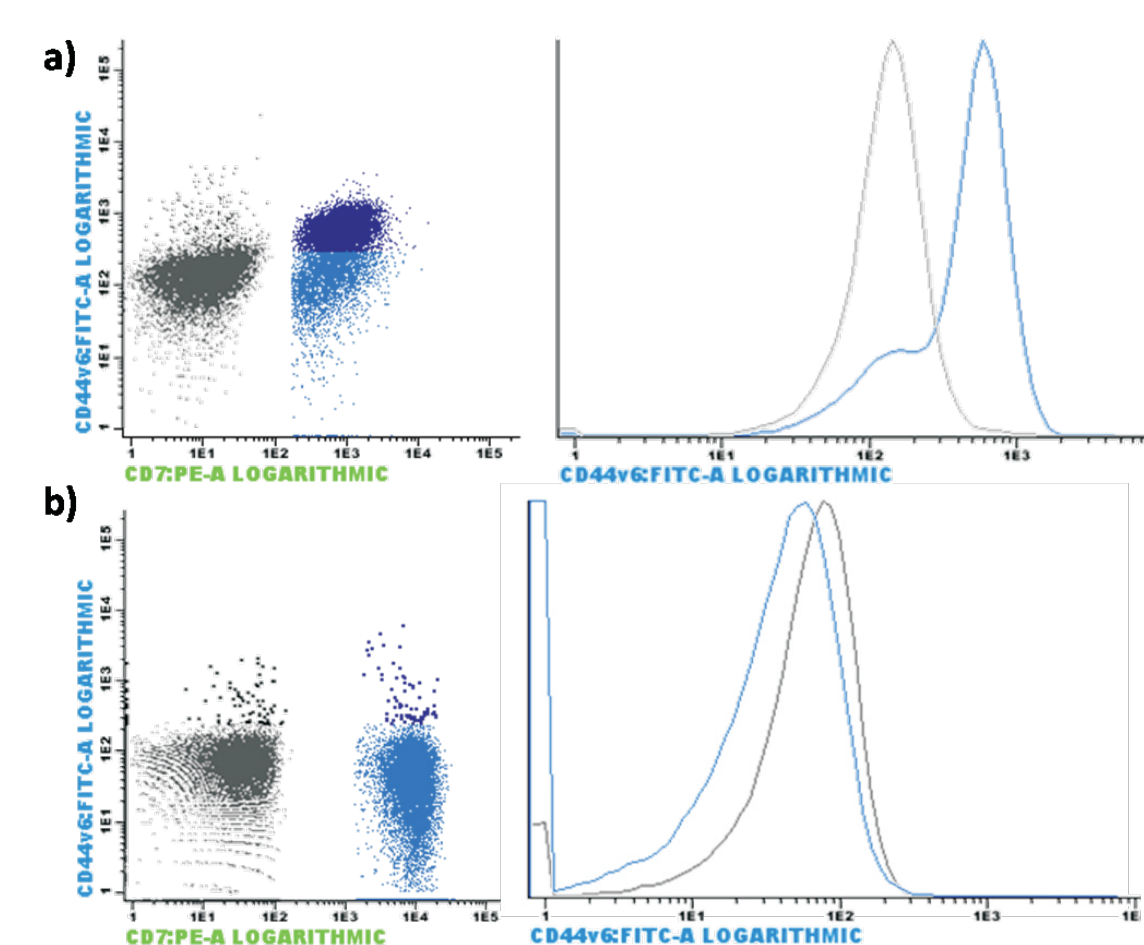


Figura 7. a) Caso positivo para CD44v6. b) Caso negativo para CD44v6.

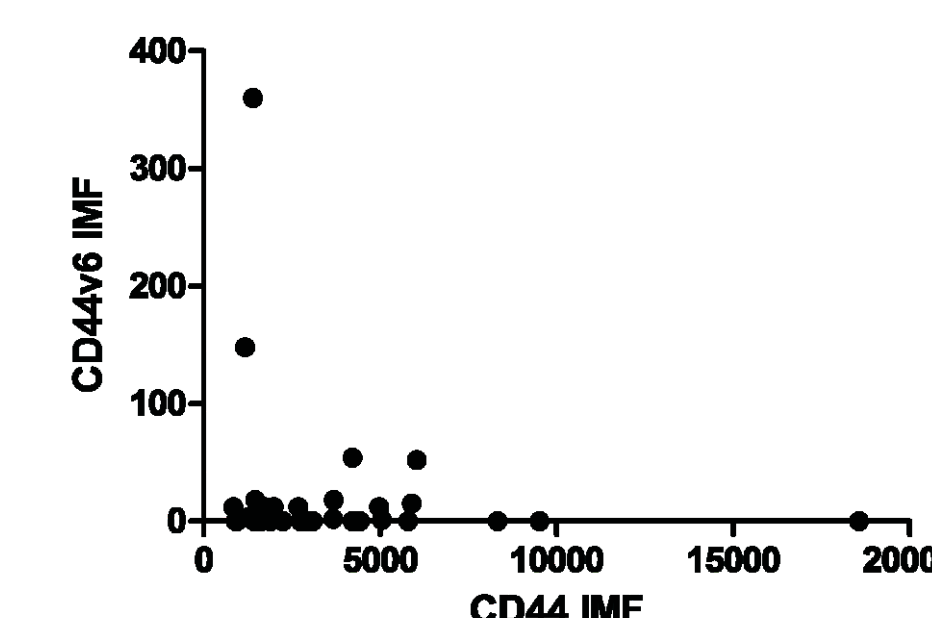


Figura 8. Correlação entre expressão de CD44 e CD44v6. $n = 35$, $r = -0,045$, $p = 0,796$. Análise estatística realizada pelo teste de Spearman.

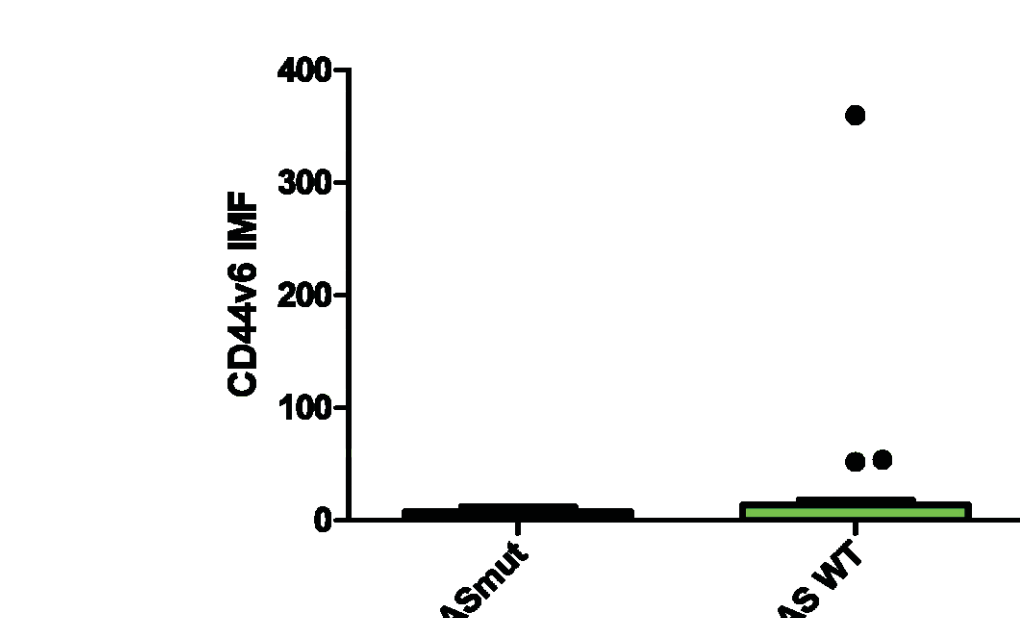


Figura 9. Expressão de CD44v6 de acordo com status do *RAS*. *N/KRAS* mut, $n = 5$; *N/KRAS* WT, $n = 21$. $p = 0,94$. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney. mut - mutado; WT - selvagem.

CONCLUSÕES

A expressão de CD44 está ligada ao nível maturativo do blasto, tendo LLA-ETPs maior expressão. LLb-T e recaída de LLb-T possuem uma menor expressão de CD44 que LLA-T. Mutação em *N/KRAS* pode levar a uma maior expressão de CD44 em LLA-T pediátricas.