

# Correlação entre a expressão celular do CD44 e formas tumorais das leucemias linfoblásticas(\*)

## *Correlation between the cellular expression of CD44 and the forms of acute lymphoblastic leukemia*

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior<sup>1</sup>, Wilson Savino<sup>2</sup>, Raquel Ciuvalschi Maia<sup>3</sup>, Jane de Almeida Dobbin<sup>3</sup>, Maria Kadma Carriço<sup>3</sup>, Hansa Cabral Harab<sup>4</sup>, Maria do Socorro Pombo de Oliveira<sup>5</sup>

### Resumo

O CD44 é uma molécula de adesão que se expressa em linfócitos-B e T, participa na mediação de adesão destas células e dos componentes da matriz extracelular e na adesão a células endoteliais vasculares.

A proposta deste estudo foi a de investigar a expressão celular do CD44 em 108 pacientes portadores de leucemias linfoblásticas (57 leucemias linfóides agudas de linhagem B e 51 de células-T), através de uma metodologia que inclui a análise citomorfológica e imunofenotipagem, com um painel de anticorpos monoclonais detectados pelas técnicas da imunoperoxidase conjugada, e imunofluorescência com análise por citometria de fluxo. Inicialmente, investigamos a correlação do CD44 com as distintas fases de diferenciação celular destas leucemias, determinadas pela expressão antigênica. Em seguida, investigamos a correlação desta molécula com os achados clínico-patológicos, como a presença de massas tumorais, adenomegalias, infiltração de células leucêmicas no sistema nervoso central e em outros órgãos, além da presença de células blásticas no sangue periférico. Paralelamente ao estudo das leucemias, também investigamos a expressão de CD44 em linfócitos do sangue periférico oriundos de 11 indivíduos sadios. A expressão de CD44 foi positiva em 83 casos (76,8%) das leucemias linfóides agudas, sendo 46 casos (80,7%) das LLA de linhagem B, e em 37 casos (72,5%) de LLA de células-T. Nos quatro subgrupos que compõem as LLA de linhagem B, observamos a expressão desta molécula em dois casos (66,7%) das LLA do tipo null; em 34 casos (77,3%) das LLA do tipo comum e em todos os casos de LLA pré-B (cµ+) e LLA-B (Smlg+). Já nas LLA de células-T, a expressão do CD44 mostrou-se variável nos três subgrupos que compõem estas leucemias. No Subgrupo I (LLA pré-T), todos os nove casos (100%) foram CD44 positivos; nos 14 casos do Subgrupo II (LLA-T intermediária), quatro casos (28,6%) foram CD44 positivos e no Subgrupo III (LLA-T-medular) o CD44 foi positivo em 24 casos (85,7%).

A correlação da expressão de CD44 com o perfil clínico-patológico destas LLA, mostrou que a expressão desta molécula correlacionou-se com as leucemias que apresentavam formas tumorais da doença, traduzida pela presença de hepatomegalias, esplenomegalias, linfadenopatias e, principalmente, nos casos em que havia a presença de massas tumorais abdominais e de mediastino, assim como infiltração no sistema nervoso central, quando comparadas as leucemias com doença restrita ao sistema hematopoético.

Com estes dados, nós sugerimos que o CD44 pode ser empregado como marcador adicional na monitorização da evolução prognóstica e para avaliação dos mecanismos de evolução patológica das leucemias linfóides agudas.

**Palavras-chaves:** anticorpo monoclonal CD44; leucemia linfóide aguda

Trabalho realizado no Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer-INCA-RJ, para elaboração de tese de mestrado.

1Professor Assistente do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo-Cruz-FIOCRUZ-RJ; 3Médicas Hematologistas do Instituto Nacional de Câncer-RJ; 4Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer; 5 Médica Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer - RJ.

Endereço para correspondência: Laboratório de Marcadores Celulares - Centro de Transplante de Medula Óssea - Instituto Nacional do Câncer - Praça da Cruz Vermelha, 23/7º andar - 20239-130 - Rio de Janeiro - RJ.

## Abstract

*CD44 is an adhesion molecule expressed by B and T lymphocytes, that mediates cell attachment to extracellular matrix components and adhesion to endothelial cells.*

*The purpose of this study is to investigate the CD44 expression in 108 patients with lymphoblastic leukemia (57 B lineage ALL and 51 T-cell ALL) with a methodology that includes morphological analysis and immunophenotyping with a panel of monoclonal antibodies detected by standard techniques such as immunoperoxidase conjugated methods and flow-cytometry. Initially we investigated the correlation of CD44 expression with all levels of cellular maturation of these leukemia, established according to antigen expression. Then, we investigated the correlation of this molecule with clinical-pathologic features such as mediastinal mass, adenomegaly and infiltration of the central nervous system, and number of blastic cells in peripheral blood. In addition, we also investigated CD44 expression in peripheral lymphocytes from 11 healthy individuals. The CD44 expression was positive in 83 (76.8%) out of 108 ALL cases studied. In B precursors and B-ALL its expression was observed in 46 (80.8%) out of 57 cases and 37 (72.5%) out of 51 cases of T-ALL. In the four subgroups of B precursor ALL, the expression of this molecule was found in 2 cases (66.7%) of null-ALL, in 34 cases (73.5%) of C-ALL and all cases of pre-B (cμ+) and B-ALL (Smlg+). Considering, T-cell ALL, the CD44 expression was variable among the three subgroups of this leukemia. In Subgroup I (pre-T ALL) all 9 cases were positive (100%). In 14 Subgroups II (intermediate T-cell ALL) CD44 was positive in 4 cases (28.6%) and amongst the 28 cases of Subgroup III, CD44 was positive in 24 cases (85.7%). In lymphocytes from the control groups, CD44 expression was positive in all cases with percentages of reactivity ranging from 80% to 100% of cases, which homogeneously exhibited high density of CD44, as assessed by cytofluorimetry. The correlation of CD44 expression in terms of clinical-pathologic profile of ALL demonstrated that high levels of CD44 were associated to tumoral forms of disease expressed as lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, tumoral masses and infiltration of central nervous system. However, we did not find any association between CD44 and high levels of circulating blast cells.*

*These data suggest that CD44 should be considered an additional marker to monitor evolution and assess the mechanisms of pathological evolution of the lymphoblastic leukemia.*

**Key words:** CD44 monoclonal antibody; acute lymphoid leukemia

## Introdução

No sistema linfohematopoético representado por órgãos como a medula óssea e tecidos linfóides, a diferenciação celular é acompanhada por uma interação específica das células progenitoras circulantes com diferentes microambientes sésseis<sup>(1,2)</sup>.

Recentemente, com a tecnologia de híbridos, tornou-se possível a produção de anticorpos monoclonais (AcMo) com alta especificidade, podendo-se considerar este evento como um passo importante para o melhor entendimento na caracterização de antígenos de membrana de células do sistema linfohematopoético possibilitando, desta forma, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na hemopoiese normal

e nos processos leucêmicos. Com a utilização de AcMo, permitiu-se assim um melhor conhecimento do papel das moléculas de adesão celular na regulação da hemopoese normal, em eventos biológicos como no tráfego de linfócitos e resposta imune, bem como em mecanismos fisiopatológicos envolvidos na leucemogênese<sup>(3,4)</sup>.

Dentre as diversas moléculas de adesão presentes nestes fenômenos, destaca-se a família do CD44 frequentemente associada a eventos de migração celular, e que nos processos neoplásicos está relacionada à metastização de células tumorais, estando sua expressão correlacionada com o prognóstico desfavorável de diversas formas de câncer, inclusive leucemias e linfomas<sup>(4,5)</sup>.

Nas leucemias linfóides agudas a expressão desta molécula parece correlacionar-se com o seu comportamento biológico como os mecanismos de disseminação extramedular das células leucêmicas, a infiltração no sistema nervoso central, formação de massas tumorais e outros parâmetros de mau prognóstico tais como leucometria elevada e número elevado de linfoblastos leucêmicos no sangue periférico<sup>(4,5)</sup>.

Os avanços recentes acima citados na caracterização fisiopatológica das leucemias, possibilitam a realização deste estudo que visou correlacionar a expressão do CD44 nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na leucemogênese. De forma mais específica os objetivos principais deste estudo foram: i) investigar a expressão do CD44 em leucemias linfóides agudas através de duas abordagens técnicas distintas, pela citofluorimetria e imunocitoquímica; ii) correlacionar a expressão do CD44 com o perfil fenotípico e, iii) correlacionar esta expressão com o comportamento clinicopatológico das leucemias linfóides agudas.

## Material e métodos

### Pacientes

Durante o período de 1992-1994, foram selecionados para este estudo 108 casos de LLA antes de qualquer intervenção terapêutica.

Juntamente com as amostras de sangue periférico e de medula óssea foram coletados dados clínicos e laboratoriais dos pacientes para as análises posteriores, tais como a idade, o sexo, a presença de adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, além de massas tumorais (mediastinal e abdominal) e comprometimento do sistema nervoso central. Como grupo controle, foram analisados linfócitos de 11 indivíduos normais que serviram como grupo controle.

### Critérios adotados

Para o diagnóstico das leucemias agudas seguiu-se o critério da observação da presença de mais de 25% de células blásticas no sangue periférico e no aspirado de medula óssea, cuja avaliação morfológica seguiu os critérios adotados pela classificação FAB<sup>(6)</sup>.

Foram excluídos deste trabalho os casos em que os pacientes apresentavam morfologia das células blásticas compatível com LMA, positividade à reação citoquímica do Negro de Sudam, além da quimioterapia antileucêmica prévia.

As reações foram consideradas positivas quando mais que 20% das células apresentaram reação positiva para a maioria dos anticorpos, inclusive o AcMo anti-CD44.

Chamou-se de *LLA de células-T* quando mais que 20% dos blastos apresentavam positividade para os antígenos pan-T ou seja CD7 e CD3, com os seguintes subtipos: as LLA de células-T mais primitivas ou de células pré-T só expressam os antígenos CD7 e o CD3 intracitoplasmático (cCD3), neste grupo também pode ser observado a presença de CD34, CD38, HLADr e o TdT e pela expressão negativa de CD2, CD4 e CD8; as LLA correspondentes ao Grupo II ou timócitos intermediários se caracterizaram pela aquisição do CD2, CD1a e pela expressão simultânea do CD4 e CD8, mantendo a expressão de CD7, cCD3. O Grupo III ou timócitos maduros que expressam o CD7, CD2 e o CD3 de superfície (mCD3), com a dicotomia da expressão do CD4 e CD8<sup>(7-9)</sup>.

Chamou-se de *LLA de linhagem B*, quando mais que 20% das células leucêmicas apresentavam antígenos descritos como de linhagem B e pré-B, conforme os critérios descritos por Freedman AS & Nadler LM e Foon KA & Tood ED<sup>(8,9)</sup>: As LLA do tipo *null* expressam o HLADr e CD19, podendo também ser encontrado o CD34. As LLA do tipo *comum* ou *calla* positiva quando as células expressam o "antígeno comum associado à leucemia linfóide aguda" (*CALLA*), além do HLADr e CD19. As LLA pré-B são aquelas cujas células blásticas expressam o fenótipo: HLADr, CD19, CD22 intracitoplasmático (cCD22), CD20, CD10 e cadeia "mü" intracitoplasmática (cµ+). Finalmente, as LLA de células-B, são aquelas cujas células blásticas apresentam expressão completa de imunoglobulina de superfície (SmIg)<sup>(7-9)</sup>.

### Metodologia

Células mononucleares foram isoladas das amostras de sangue periférico e medula óssea, colhidas com heparina (liquemine, Roche, USA), separadas por gradiente de densidade por Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma, St. Louis, USA), em centrífuga refrigerada durante 20 minutos a 2000 rpm. A suspensão de células mononucleares na concentração de  $1,6 \times 10^6/\text{ml}$  era homogeneizada, e para cada citocentrifugado eram utilizados 100 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) numa centrifugação de 400 rpm durante 4 minutos em uma citocentrífuga. Os citocentrifugados eram mantidos em temperatura ambiente para secagem até o dia seguinte, e então embalados dois a dois em papel de alumínio e congelados a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização dos testes.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na identificação de diferentes marcadores celulares de leucócitos humanos

AcMo (Clones)	Identificação	Marcadores identificados
Leu 6	CD1a	Timócitos corticais
OKT11, RF11	CD2	T11 (recep. de hemácias de carneiro)
OKT3, Leu 4	CD3	T3, $\beta$ tcr, gp 26, 20, 16
OKT4, Leu 3a	CD4	T4, gp 56
3A1, RFT2	CD7	T1, gp 40
Leu 2a, OKT8	CD8	T8, gp 32
VIL-1, RFAL1	CD10	CALLA, gp100
MCS-2, MY7	CD13	Receptor para Aminopeptidase N
MO2, FMC17	CD14	gp55, antígeno associado a monócito
RFD9, HD37	CD19	B4, gp 95 (pan linfócito-B)
To15, CLB/BY	CD22	Leu 14.
MY10, 12.8.	CD34	gp 105-120 ( <i>stem cell</i> )
LEU 17, OKT 10	CD38	Células ativadas
BRIC-35	CD44	pgp-1 (molécula de adesão)
M852	CD56	Célula NK
FMC56, GRB1	anti-HLADr	Antígeno de classe II HLA
TdT	anti-TdT	Enzima nuclear TdT
Cadeia $\mu$	anti-cadeia $\mu$	Cadeia pesada IgM
Cadeia $\kappa$	anti-cadeia $\kappa$	Cadeia leve <i>kappa</i> . da Ig
Cadeia $\gamma$	anti-cadeia $\gamma$	Cadeia leve <i>lambda</i> da Ig
IgM	anti-IgM	Imunoglobulina IgM

Procedências: OKTs (Orto séries USA); RFs (Royal Free UK, doado pelo prof. G. Janossy-Londres, Inglaterra), LEUs (Becton Dickinson - S. José Ca., USA); COULTER (Coulter Clone F.L.); GRs (GR série Granada, doado pelo Prof. Garrido Torres - Granada, Espanha); FMCs (Flinders Medical Center, doado pelo prof. H. Zola - Belford Park South, Austrália), TdT (Sigma Diagnostic - St. Louis, USA). Anti-CD56 (Dako corporation - Sta. Bárbara, USA), anti CD44 (BRIC-35, doado pelo Dr. Joseph Mirro Department of Hematology-Oncology, Children's Hospital, Pittsburg, PA, USA).

A imunofenotipagem foi realizada com painel de AcMo pelos métodos da imunofluorescência direta e indireta, com análise por citometria de fluxo ou pelo método imunoenzimático utilizando anticorpos conjugados à peroxidase. Os anticorpos empregados no presente trabalho estão listados na Tabela 1.

O painel de AcMo sistematicamente utilizados na caracterização das leucemias agudas testados foi composto da seguinte forma: CD19, CD20, CD7, CD2, CD1a, mCD3, CD4, CD8, CD13, CD34, CD38, HLADr, CD10, IgM, Kappa ( $\kappa$ ) e Lambda ( $\gamma$ ). Antígenos intracelulares como o TdT, cCD3 e cCD22 e  $\mu$  foram testados através da técnica imunoenzimática da imunoperoxidase.

Os linfócitos periféricos oriundos do grupo controle foram tipados por citometria de fluxo com painel de AcMo que incluía a detecção de CD44 e ainda CD3, CD2, CD4, CD8, CD19, CD56 e CD14. A pesquisa do CD44 foi realizada com AcMo Bric-35 (classe IgG-1) empregando uma diluição de 1:20.

### Análise estatística

Para o estudo da correlação entre a expressão de CD44 com os diversos parâmetros clínicos e laboratoriais das LLA foram calculadas médias aritméticas, medianas e desvios padrões. Para comparação das variáveis em estudo, foi empregado o teste não paramétrico do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), em que utilizamos os valores observados e esperados para verificarmos se as discrepâncias foram significativas ou não.

### Resultados

Os dados referentes a classificação imunofenotípica das LLA resumidas na Figura 1 demonstram que as LLA do tipo *comum* foi predominante entre as LLA de linhagem B com 40,74%, do total das LLA estudadas, seguido pelos grupos correspondentes a LLA do tipo pré-B ( $c\mu+$ ), B ( $SmIg+$ ) correspondendo a 4,6% cada e LLA do tipo *null* em 2,78% dos casos. Nela também podemos observar valores que variam de 8,33% para LLA pré-T, 12,96% para as LLA correspondente aos timócitos intermediários e 25,93% para as LLA de células-T que corresponde aos timócitos medulares mCD3+.

Na Tabela 2, estão resumidos dados gerais referentes aos grupos estudados, que incluem a idade, o sexo e principais características clínicas dos pacientes como a presença de linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, presença de massas tumorais (mediastinal e abdominal), além de infiltração leucêmica no sistema nervoso central.

A idade dos pacientes no grupo LLA não-T (57 casos) variou de nove meses a 60 anos com uma mediana de 10 anos nos pacientes do Grupo I (LLA pré-B), no segundo grupo (LLA-B), ela variou de quatro a 21 anos, apresentando uma mediana de 4. A idade dos pacientes do grupo de LLA de células-T (51 casos) variou de um a 63 anos, com uma

mediana de 11. O grupo controle apresentou idades que variaram de 18 a 50 anos com 32 de mediana.

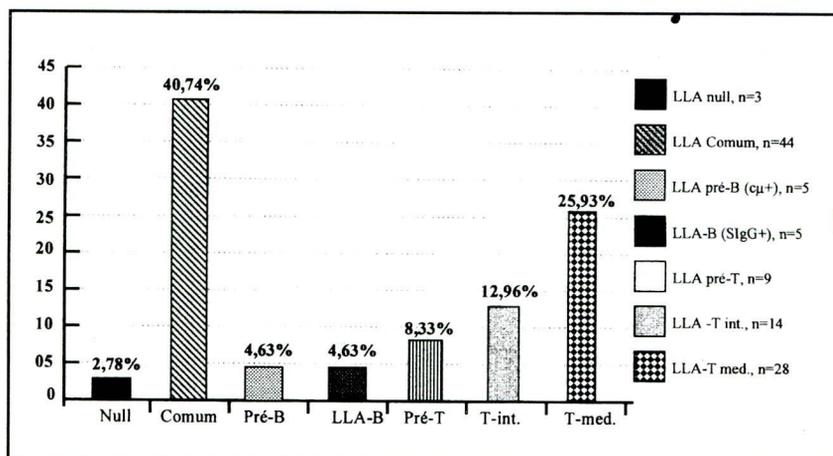


Figura 1 - Distribuição das leucemias linfóides agudas segundo a classificação imunológica.

Obs.: Null (LLA do tipo Null), Comum (LLA do tipo "Comum" ou Calla positivo), Pré-B  $c\mu+$  (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada  $\mu$ ), LLA-B (SIgG+) (LLA de células-B com expressão de imunoglobulinas de superfície), Pré-T (LLA pré-T), T-int. (LLA-T intermediária), T-med. (LLA-T medular).

Tabela 2 - Características gerais dos grupos estudados

	LLA pré-B* (n = 52)	LLA-B (n = 5)	LLA-T (n = 51)	Controle (n = 11)
Idade (me)	9-60 (10)	4-21 (4)	1-63 (11)	18-50 (32)
Sexo M.	26	04	36	11
F.	26	01	15	(-)
Linfad.	20	03	26	(-)
Mass. med.	01	00	12	(-)
Mass. abd.	00	05	01	(-)
Esplenomegalia	22	02	27	(-)
Hepatomegalia	21	02	23	(-)
Envol. SNC.	09	02	10	(-)
Leuc. ( $\times 10^3$ )	1,0 - 448,0	1,5 - 600,0	13,5 - 720,0	4,0 - 11,0

Abreviações: F (Sexo feminino); Leuc. (Leucometria); LLA pré-B\* (LLA pré-B do tipo Null, Comum e pré-B  $c\mu+$ ); Linfad. (Linfadenopatia); Mass. abd. (Massa Abdominal); Mass. med. (Massa Mediastinal); M (Masculino); me (mediana); Envol. SNC (Envolvimento do Sistema Nervoso Central).

No primeiro grupo que corresponde as LLA de células pré-B não foi observada predominância de sexo, mostrando 26 do sexo masculino e igual número para pacientes do sexo feminino. Entretanto, quando analisamos os outros dois grupos de LLA, houve uma predominância do sexo masculino sobre o feminino com quatro casos do sexo masculino para um do sexo feminino no grupo correspondente a LLA de células-B. O grupo das LLA de células-T mostrou também um predomínio de indivíduos do sexo masculino em relação ao feminino, com valores de 36 e 15 respectivamente.

Foi observada linfadenopatia em 20 casos de LLA pré-B, e em três casos de LLA-B e, em 26 casos de LLA de células-T.

A presença de massa abdominal foi observada em todos os pacientes com LLA-B ( $n = 5$ ) e em um nos pacientes com LLA-T. Por outro lado, 13 pacientes em nossa casuística apresentavam massa de mediastino, 12 dos quais pertenciam ao grupo das LLA de células-T e apenas um no grupo das LLA não-T, pertencente ao subgrupo correspondente as LLA pré-B.

Quarenta e sete pacientes apresentavam esplenomegalia, sendo 24 pertencentes ao grupo das LLA não-T e 27 ao grupo das LLA de células-T. No primeiro grupo citado, 22 pertenciam ao subgrupo pré-B e dois ao grupo das LLA-B.

A hepatomegalia foi observada em 24 pacientes do grupo das LLA não-T, sendo que

22 casos eram de LLA pré-B e dois casos de LLA-B. Nas LLA de células-T a hepatomegalia foi observada em 23 casos.

Já o envolvimento do sistema nervoso central em pacientes com LLA foi observado em 21 pacientes do total estudado, sendo que nove eram pacientes com LLA pré-B, dois nas LLA de células-B e 10 eram do grupo pertencente as LLA de células-T.

A contagem de leucócitos no sangue periférico ao diagnóstico variou de 1,0 a 448,0  $\times 10^3/\text{mm}^3$  nos indivíduos com LLA de células pré-B, de 1,5 a 600,0  $\times 10^3/\text{mm}^3$  em pacientes com LLA-B e, 13,5 a 720,0  $\times 10^3/\text{mm}^3$  nas LLA de células-T. O grupo controle por sua vez mostrou uma leucometria que variou de 4,0 a 11,0  $\times 10^3/\text{mm}^3$ .

O percentual de células blásticas no sangue periférico, variou de um a 100 em todos os três grupos de LLA estudados. As medianas foram 80 nos dois primeiros grupos e 90 no grupo correspondente as LLA de células-T.

Os dados sobre a expressão do CD44 nas leucemias linfoblásticas com seus distintos subtipos estão demonstrados na Tabela 3 e nas Figuras 2 e 3.

A expressão do CD44 mostrou-se positiva em 41 casos das LLA pré-B (78,8%), em todos os cinco casos de LLA-B (100%) e em 37 (72,5%) das LLA de células-T, totalizando 83 casos positivos (76,85%) do total das LLA estudadas.

Tabela 3 - Expressão de CD44 nas leucemias linfóides agudas

LLA	Total	CD44(+) nº (%)	CD44(-) nº (%)
LLA pré-B*	52	41 (78,8)	11 (21,2)
LLA-B	05	05 (100)	00 (-)
LLA-T	51	37 (72,5)	14 (27,5)
Total	108	83 (76,85)	25 (23,15)

Obs.: \*LLA do tipo null, comum e pré-B (c $\mu$ +);  $\chi^2 = 2,15$  ( $p > 0,05$ )

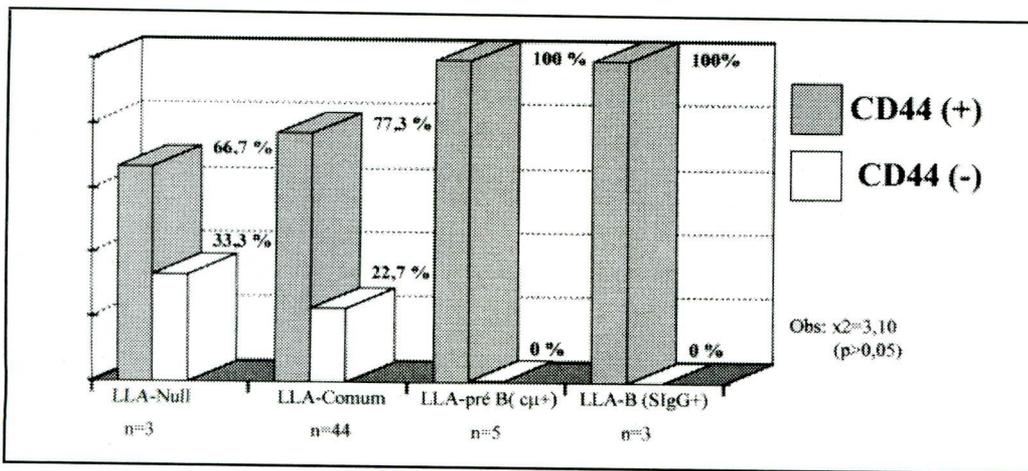


Figura 2 - Leucemia linfóide aguda de linhagem-B e expressão do CD44

Obs.: LLA-Null (Leucemia linfóide aguda do tipo Null), LLA-Comum (Leucemia linfóide aguda do tipo Calla positivo), LLA-pré-B (Cµ+), (Leucemia linfóide aguda pré-B com cadeia µ intracitoplasmática), LLA-B (Leucemia aguda de células-B)

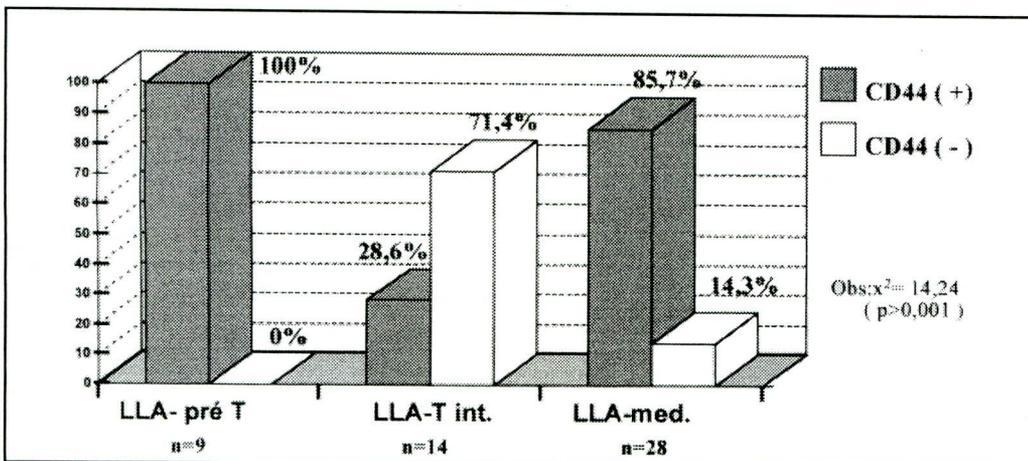


Figura 3 - Leucemia linfóide aguda de células-T e expressão de CD44

Obs.: LLA-pré-T (Leucemia linfóide aguda do tipo pré-T), LLA-T-int. (Leucemia linfóide aguda T-intermediária), LLA-T med. (Leucemia linfóide aguda T-medular).

A análise do percentual do CD44 nas LLA de linhagem-B mostrou que ela se deu na maioria dos casos (80,7%). Apesar destas positivities apresentarem-se de certa forma uniforme nos quatro subgrupos desta linhagem de LLA com positividade geral superior a 60%, observamos que esta expressão aumentava a medida que estas células leucêmicas apresentavam um fenótipo que denotava um desenvolvimento de LLA pré-B para B (Figura 2), desta forma, observamos que nas LLA do tipo null, a positividade foi de 66,7%, nas LLA do tipo comum de 77,3% e em todos os casos das LLA do tipo pré-B (cµ+), assim como nas LLA-B (SmIg+).

Apesar desta observação, teste do  $\chi^2$  mostrou não haver diferença estatisticamente significativa a nível de 5% entre a expressão posi-

va ou negativa do CD44 nos quatro subgrupos desta linhagem de LLA.

Nas LLA do tipo Pré-T todos os nove casos analisados eram CD44 positivos. Entretanto, nas LLA do tipo T-intermediária observamos um maior percentual de casos em que as células blásticas eram CD44 negativo (71,4%). Já nas LLA do tipo T-medular, a presença de amostras CD44+ ocorreu na maioria dos casos estudados (85,7%).

O teste do  $\chi^2$  mostrou significância a nível de 1% na diferença de expressão positiva ou negativa do CD44 entre os três subtipos desta linhagem de LLA, com  $\chi^2 = 14,24$  e ( $p < 0,01$ ).

Conforme Tabela 4, observamos que nas LLAs de linhagem B houve uma correlação da expressão do CD44 nas células blásticas dos pacientes que apresentavam infiltração tumoral para um ou mais órgãos. Dos 32 pacientes que apresentava envolvimento tumoral, 30 casos eram CD44+ (93,7%) e apenas dois casos (6,7%) foram CD44 negativos. Esta forma tumoral pode ser traduzida por linfadenopatias, esplenomegalia, hepatomegalia, alargamento de mediastino, presença de massa abdominal e infiltração leucêmica no sistema nervoso central. Em todos seis pacientes com volumosas massas tumorais mediastinal e abdominal, as células leucêmicas apresentavam uma forte expressão do CD44. Dentre os 23 casos com linfadenopatia, 18 (78,3%) apresentavam células blásticas circulantes CD44 positivo. Em relação à esplenomegalia, 83,3% dos pacientes apresentavam reação positiva ao CD44 bem como 78,3% dos 23 pacientes com hepatomegalia. Em todos os pacientes com infiltração leucêmica no sistema nervoso central, as células blásticas examinadas apresentavam forte positividade ao CD44 com grande intensidade, tanto em amostras provenientes do sangue periférico como nas oriundas do líquido cefalorraquidiano.

Os dados referentes a correlação da expressão do CD44 e o perfil clínico-patológico das LLA de células-T estão inseridos na Tabela 5. Qua-

renta e dois casos tinham aspecto clínico-tumoral caracterizado por massa mediastinal, linfadenopatia, visceromegalias e infiltração leucêmica no sistema nervoso central. Neste grupo, 85,7% dos casos apresentavam blastos positivos ao CD44 e 14,3% foram CD44 negativos. Amostras de pacientes apresentando visceromegalias como a hepatomegalia, em 23 casos, e esplenomegalia, em 27 casos, apresentavam resultados positivos ao CD44 em 18 (78,3%) e 21 (77,22%) casos respectivamente. Dos 26 pacientes relatados com linfadenopatia, 23 casos (88,5%) apresentavam positividade ao CD44. Todos os casos com massa mediastinal e abdominal apresentavam CD44 fortemente positivo em suas células blásticas, assim como os casos em que havia infiltração leucêmica no sistema nervoso central onde o CD44 foi fortemente positivo tanto para células leucêmicas provenientes do sangue periférico como em amostras provenientes do líquido, valendo salientar que estes indivíduos apresentavam também hiperleucocitose com alto percentual de células blásticas no sangue periférico. Neste grupo de LLA, dos nove pacientes que apresentavam a doença restrita ao sistema hematopoético, observou-se que quatro casos (44,4%) foram CD44 positivo e cinco (55,6%) CD44 negativo.

A Figura 4 mostra os padrões dos histogramas de intensidade de fluorescência ao CD44 pela citometria de fluxo em algumas amostras de linfócitos normais oriundos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e de linfoblastos leucêmicos oriundos de portadores de LLA de linhagem-B e T.

Tabela 4 - Expressão de CD44 e aspecto tumoral das leucemias linfoblásticas de linhagem-B

Dados clínicos	Nº casos	CD44(+) nº (%)	CD44(-) nº (%)
<b>Tumoral</b>	<b>42</b>	<b>40 (95,2)</b>	<b>02 (4,8)</b>
Massa mediastinal	01	01 (100)	00 (-)
Massa abdominal	05	05 (100)	00 (-)
Linfadenopatia	23	18 (78,3)	05 (21,7)
Esplenomegalia	24	20 (83,3)	04 (16,7)
Hepatomegalia	23	18 (78,3)	05 (21,7)
Sistema nervoso central	11	11 (100)	00 (-)
<b>Não tumoral</b>	<b>15</b>	<b>06 (40,0)</b>	<b>09 (60)</b>

Obs.:  $\chi^2 = 15,9$  ( $p < 0,01$ ). Significativo ao nível de 1%.

Tabela 5 - Expressão de CD44 e aspecto tumoral das leucemias linfoblásticas de células-T

Dados clínicos	Nº de casos	CD44(+) nº (%)	CD44(-) nº (%)
<b>Tumoral</b>	<b>42</b>	<b>36 (85,7)</b>	<b>06 (14,3)</b>
Massa mediastinal	12	12 (100)	00 (-)
Massa abdominal	01	01 (100)	00 (-)
Linfadenopatia	26	23 (88,5)	03 (11,5)
Esplenomegalia	27	21 (77,7)	06 (22,3)
Hepatomegalia	23	18 (78,3)	05 (21,7)
Sistema nervoso central	10	10 (100)	00 (-)
<b>Não tumoral</b>	<b>09</b>	<b>04 (44,4)</b>	<b>05 (55,6)</b>

Obs.:  $\chi^2 = 7,00$  ( $p < 0,01$ ). Significativo a nível de 1%

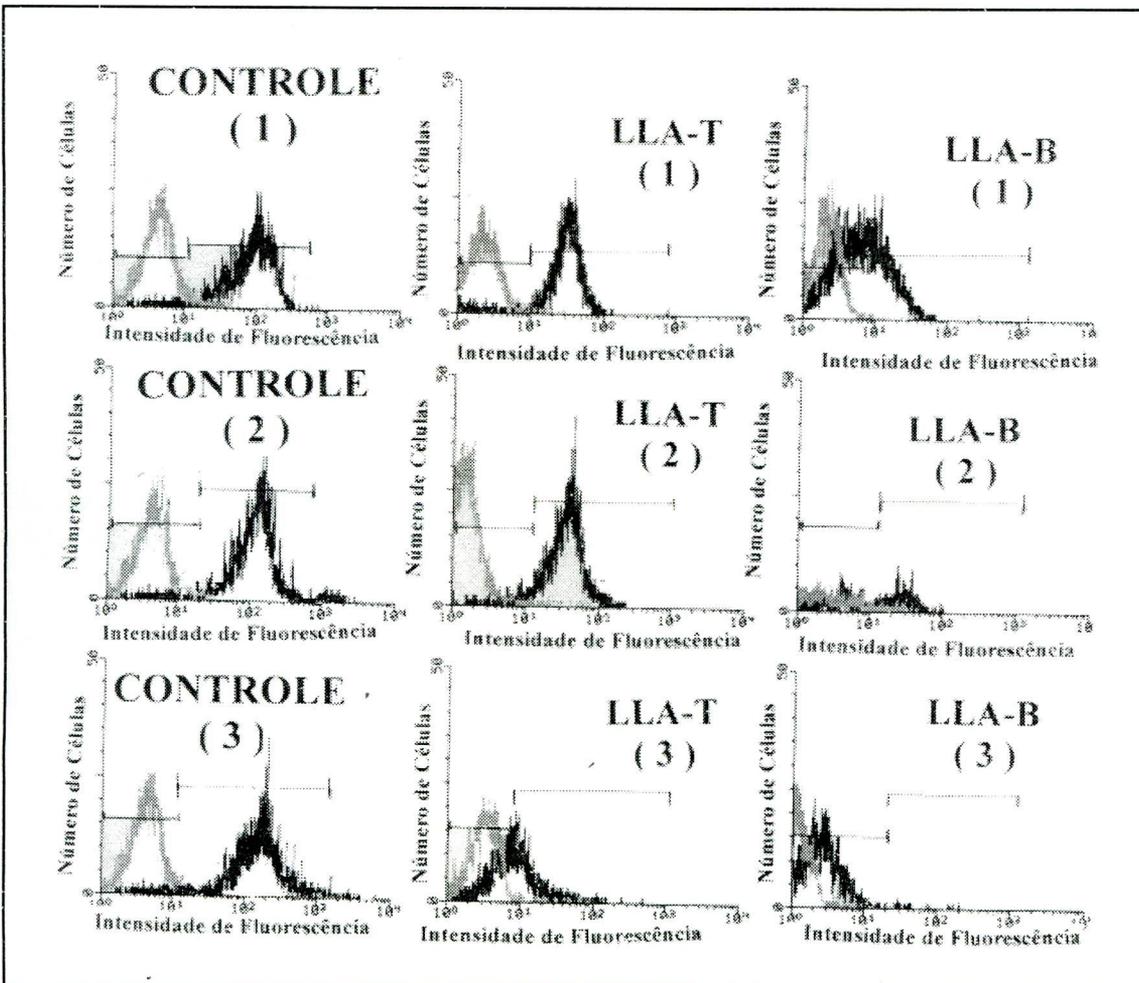


Figura 4 - Padrões de histogramas de intensidade de fluorescência de CD44 em linfócitos normais oriundos do sangue periférico de indivíduos do grupo controle e em linfoblastos leucêmicos provenientes de pacientes em LLA de linhagem-B e T

Obs.: Cada histograma corresponde a um indivíduo. Em cinza, o perfil das células sem o AcMo antiCD44 e em preto histogramas de células marcadas. No eixo das abscissas está relacionada a intensidade de fluorescência e no eixo das ordenadas, o número de células analisadas.

## Discussão

Vários estudos já demonstraram as evidências de que o fenótipo imunológico das células envolvidas na leucemogênese tem importância no prognóstico independente de outras variáveis como a leucometria, idade, sexo e classificação morfológica<sup>(7-9)</sup>.

Embora muitos destes antígenos sirvam operacionalmente como marcadores de diferenciação celular, muitas destas moléculas representam receptores de adesão celular ou outros tipos de glicoproteínas com funções estabelecidas na comunicação, intercelular, como receptores para fatores de crescimento, citocinas, imunoglobulinas, moléculas do sistema complemento além de receptores para vírus<sup>(7, 8)</sup>.

O CD44 é uma molécula de adesão normalmente relacionada ao tráfego de linfócitos, não se expressando em células em repouso assim como em linfócitos-B e T presentes nos centros germinativos dos linfonodos, e timócitos corticais<sup>(3, 10-12)</sup>.

Nas células sanguíneas o CD44 tem o papel de mediador de eventos fisiológicos relacionados à adesão celular, como no deslocamento de linfócitos dos órgãos linfóides primários aos secundários (*homing*), adesão de leucócitos ao endotélio vascular resultando no direcionamento dos mesmos à sítios de inflamação, além de homing de células progenitoras à medula óssea após transplante, mediando também a disseminação de metástases nos processos neoplásicos<sup>(3-5)</sup>.

Na disseminação metastática por células neoplásicas, a firme aderência ao endotélio parece ser mediada principalmente pelo CD44 como já foi observado em linfomas e em carcinoma de cólon e mama<sup>(4, 5)</sup>. Em algumas formas de leucemias linfóides agudas, a expressão desta molécula parece correlacionar-se ao comportamento clínico-biológico dos leucócitos leucêmicos como na propensão destas células de se infiltrarem em sítios extra-medulares como no sistema nervoso central, formação de massas tumorais, além de uma maior incidência de hepatoesplenomegalias e linfadenopatias<sup>(5)</sup>.

No presente estudo, analisamos a expressão de CD44 em leucemias linfóides agudas, procurando estabelecer correlações entre a expressão desta molécula e diversos parâmetros clínicos e laboratoriais da doença, em busca de explicações para a diversidade patogênica da doença.

Na diferenciação dos linfócitos-B a expressão desta molécula mostra-se presente em praticamente todos os estágios de diferenciação celular, inclusive nos linfócitos-B circulantes, desempenhando papéis que variam desde a sustentação das células progenitoras desta linhagem ao microambiente medular e mediação da migração das mesmas aos órgãos linfóides secundários e tecido linfóide de mucosa<sup>(13)</sup>.

Neste estudo observamos que os casos CD44 fortemente positivos aumentavam em relação ao subtipo de diferenciação leucêmica das LLA de linhagem B. Ou seja, o CD44 foi positivo em 66,7% dos casos do tipo null, em 77,3% das LLA do tipo comum e em todos os casos de LLA pré-B (cμ+) assim como nas LLA-B (SmIg+). Estes achados corroboram com os dados obtidos na literatura que relacionam que os níveis de CD44 na superfície celular aumentam proporcionalmente a maturação destes linfócitos das fases pré-B para B<sup>(13)</sup>.

Já na ontogenia dos linfócitos-T, o CD44 tem um papel mediador da migração das células progenitoras desta linhagem, da medula óssea ao timo, assim como dos linfócitos maduros deste órgão aos órgãos linfóides secundários. Isto se reflete em uma forte expressão desta molécula nos pré-timócitos e nos timócitos medulares, ao passo que os timócitos corticais são geralmente CD44 negativos ou expressam baixos níveis desta molécula, acreditando-se desta forma que o CD44 atue como mediador de direcionamento destas células aos órgãos linfóides secundários<sup>(3-5, 10, 12, 14)</sup>.

O resultado das análises de CD44 nas LLA de células-T, demonstrou nitidamente uma curva bimodal onde o percentual de células CD44 negativas predominou no tipo T-intermediário (71,4% dos casos), contrastando com os tipos pré-T, onde todos os casos

foram CD44+ e com as LLA do tipo T-medular onde o CD44 foi positivo em 85,5% dos casos. Estes achados também se correlacionaram com os relatos da literatura que postulam as expressões do CD44 nas leucemias agudas, diretamente associada ao paradigma das células normais<sup>(5, 11, 12, 14)</sup>. Reforçando esta afirmativa, as análises estatísticas demonstraram valores significativos nas discrepâncias entre níveis da expressão do CD44 nos subgrupos desta linhagem de LLA.

Há relatos na literatura que leucemias crônicas e linfomas com o fenótipo CD44+ constituem um grupo de patologias com características clínicas distintas, apresentando maior frequência de massas tumorais, infiltração no sistema nervoso central e leucometria elevada, refletindo em uma má resposta à quimioterapia<sup>(15-17)</sup>.

Nas LLA de linhagem-B observamos que dos 32 casos com infiltração tumoral, 30 casos (93,7%) eram CD44 positivos.

Nos 51 casos de pacientes com LLA-T analisados, observamos a mesma tendência da observada nas LLA de linhagem-B. No entanto, as leucemias-T estão mais associadas aos fatores de mau prognóstico como hiperleucocitose, organomegalias, infiltração no sistema nervoso central além de apresentarem com frequência volumosas massas tumorais<sup>(7-9)</sup>. Neste estudo, 42 casos apresentaram aspecto clínico tumoral traduzido pela presença de massas de mediastino e abdominal, adenomegalias generalizadas, visceromegalias e infiltração no sistema nervoso central. Destes pacientes 85,7% apresentavam no seu fenótipo a expressão do CD44 e apenas 14,3% destes casos eram CD44 negativos. Todos os pacientes com volumosas massas tumorais mediastinal e abdominal, tinham células CD44+. Já os 10 casos com infiltração por células leucêmicas no sistema nervoso central cursavam com hiperleucocitose e apresentavam o CD44 fortemente positivo tanto nas células leucêmicas oriundas do sangue periférico como nas provenientes do líquor. Estes dados sugerem que além do fenótipo CD44+ estes achados também estejam relacionados ao volume do tecido neoplásico. Entretanto, alguns autores sugerem que esta manifestação clínica seria decorrente de propriedades biológicas das células leucêmicas independente da leucometria. Estas propriedades biológicas

podem ser traduzidas pela expressão de moléculas de adesão celular dentre as quais se destacariam o CD44. Através destas moléculas as células leucêmicas se fixariam às células endoteliais da barreira hematoencefálica passando em seguida ao interior do sistema nervoso central através dos mecanismos de adesão<sup>(16-18)</sup>.

Em nosso trabalho, a análise de 108 casos de LLA, demonstrou uma incidência maior de infiltração tumoral por células com fenótipo CD44+ quando comparadas com aquelas cujo fenótipo era CD44 negativo. Desta forma, observamos uma correlação direta da expressão do CD44 em células blásticas e uma infiltração tumoral para um ou mais órgãos.

Neste contexto, é importante destacar que em alguns estudos demonstra-se a importância de isoformas distintas do CD44, relacionando-as aos eventos fisiológicos da disseminação de metástases nos processos neoplásicos, destacando-se que isoformas variantes conferem a estas células um comportamento mais agressivo<sup>(4, 18, 19)</sup>.

A escassez de estudos sobre a expressão de CD44 nas leucemias agudas e sua co-expressão com outras moléculas de adesão tais como o antígeno de função leucocitária do tipo 1 (LFA-1), o antígeno de apresentação tardia do tipo 4 ou *vary late antigen* (VLA-4) e a molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) assim envolvidas em neoplasias do sistema hematopoético, notadamente nas leucemias, merecem certamente que novos estudos sejam realizados no sentido de esclarecimento do real papel do CD44 nos mecanismos de leucemogênese das leucemias linfoblásticas.

### Conclusões

As leucemias linfoblásticas estudadas através de imunofenotipagem celular, na sua grande maioria, expressavam CD44 nos seus diversos níveis de maturação.

As leucemias linfoblásticas de células-T apresentaram uma curva bimodal em relação aos níveis percentuais de CD44, havendo estágios maturativos com maior positividade nos subgrupos pré-T e T-medular.

Dados clínicos como, presença de massas tumorais e infiltração de sistema nervoso

central, apresentaram uma maior relação com a expressão positiva ao CD44 nas células blásticas quando comparadas com as amostras CD44 negativo.

Com estes dados, sugerimos que o CD44 possa ser empregado na monitorização da evolução prognóstica e para avaliação dos mecanismos de evolução patológica nas leucemias agudas.

### Referências Bibliográficas

1. Dexter, T.M.; Spooncer, R.; Scheffel, D.R.; Lord, B.J.; Simmon, P. Haematopoietic stem cells and problem of self renewal. *Blood Cells*, 10: 315-319, 1984.
2. Gulati, G.L.; Ashton, J.K.; Hynn, B.H. - Structure and function of the bone marrow and hematopoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2(24): 495-511, 1988.
3. Haynes, B.F.; Telen, M.J.; Hale, L.P.; Denning, S.M. - CD44 a molecule involved in leukocyte adherence and T-Cell activation. *Immunology Today*, 10(12): 423-428, 1989.
4. Koopman, G; Griffioen, A.W.; Ponta, H.; Herrich, P. et al. - CD44-splice variants expression on lymphocytes and in neoplasia. *Research in Immunology*, 9(144): 750-754, 1994.
5. Cavalcanti Júnior, G.B.; Savino, W; Pombo de Oliveira, M.S. - CD44 expression in T-cell lymphoblastic leukemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 2259-2266, 1994.
6. Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.R.; Sultan, C. - The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Concordance among observers and clinical correlations. *British Journal of Haematology*, 47: 553-561, 1981.
7. Foon, K.A.; Todd, E.D. - Immunological classification of leukemia and lymphomas. *Blood*, 68: 1-31, 1986.
8. Fredman, A.S.; Nadler, L.M. - Cell surface markers in hematologic malignancies. *Seminars in Oncology*, 14(2): 193-212, 1987.
9. Pui, C.H.; Behm, F.; Crist, W.M. - Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 82(2): 343-362, 1993.
10. Patel, D.; Haynes, B.F. - Cell adhesion molecules involved in intrathymic T-cell development. *Seminars in Immunology*, 5: 283-292, 1993.
11. Dumon, D; Inhof, B.A. - Mechanisms of thymus homing. *Blood*, 81(1): 1-8, 1993.
12. Boyd, R.L.; Hugo, P. - Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunology Today*, 12(2): 71-79, 1991.
13. Law, C.L.; Clark, E.A. - Cell-Cell interaction that regulates the development of B-lineage cells. *Current Opinion in Immunology*, 6: 238-247, 1994.
14. Haynes, B.F.; Denning, S.M.; Singer, K.H.; Kurtzberg, J. - Ontogeny of T-cell precursors. A model for the initial stages of human T-cell development. *Immunology Today*, 10(3): 87-91, 1989.
15. Fredman, A.S. - Expression and functions of adhesion receptors on normal B-cell non Hodgkin's lymphomas. *Seminars in Hematology*, 30(4): 318-328, 1993.
16. Jalkanen, S.T.; Bargatze, R.F.; Herron, L.R.; Butcher, E. - A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *European Journal of Immunology*, 16: 1195-1202, 1986.
17. Ryan, D.H. - Adherence of normal and neoplastic human B-cell precursors to bone marrow microenvironment. *Blood Cells*, 19: 225-244, 1993.
18. Herlich, P.; Zöller, M.; Pals, S.T.; Ponta, H. - CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunology Today*, 14(8): 395-399, 1993.
19. Galmiche, A.; Lustembergger, P. - CD44 - invasion tumorale et metastase. *Medicine/Science*, 10: 1282-1291, 1994.