

STATUS DO GENE NOTCH1 E SUA INTERAÇÃO COM O PERFIL DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS-T

Marcela B. Mansur¹ (Doutoranda) & Dra Maria S. Pombo-de-Oliveira¹ (Orientadora)

¹ Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica CPq, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ-Brasil

INTRODUÇÃO

- A leucemia linfoblástica aguda de célula-T (LLA-T) pediátrica corresponde a ~15% dos casos de LLA;
- As análises imunofenotípicas desta neoplasia possibilitam a determinação da etapa maturativa da célula-T envolvida na doença;
- As LLAs-T são caracterizadas pela presença de alterações moleculares que desempenham papel na patogênese e no prognóstico da doença, dentre estas alterações destacamos as translocações/rearranjos cromossômicos (*SIL-TAL1* e *HOX11L2*) e as mutações somáticas (*NOTCH1*, *FBXW7*, *PTEN* e *KRAS*).

OBJETIVOS

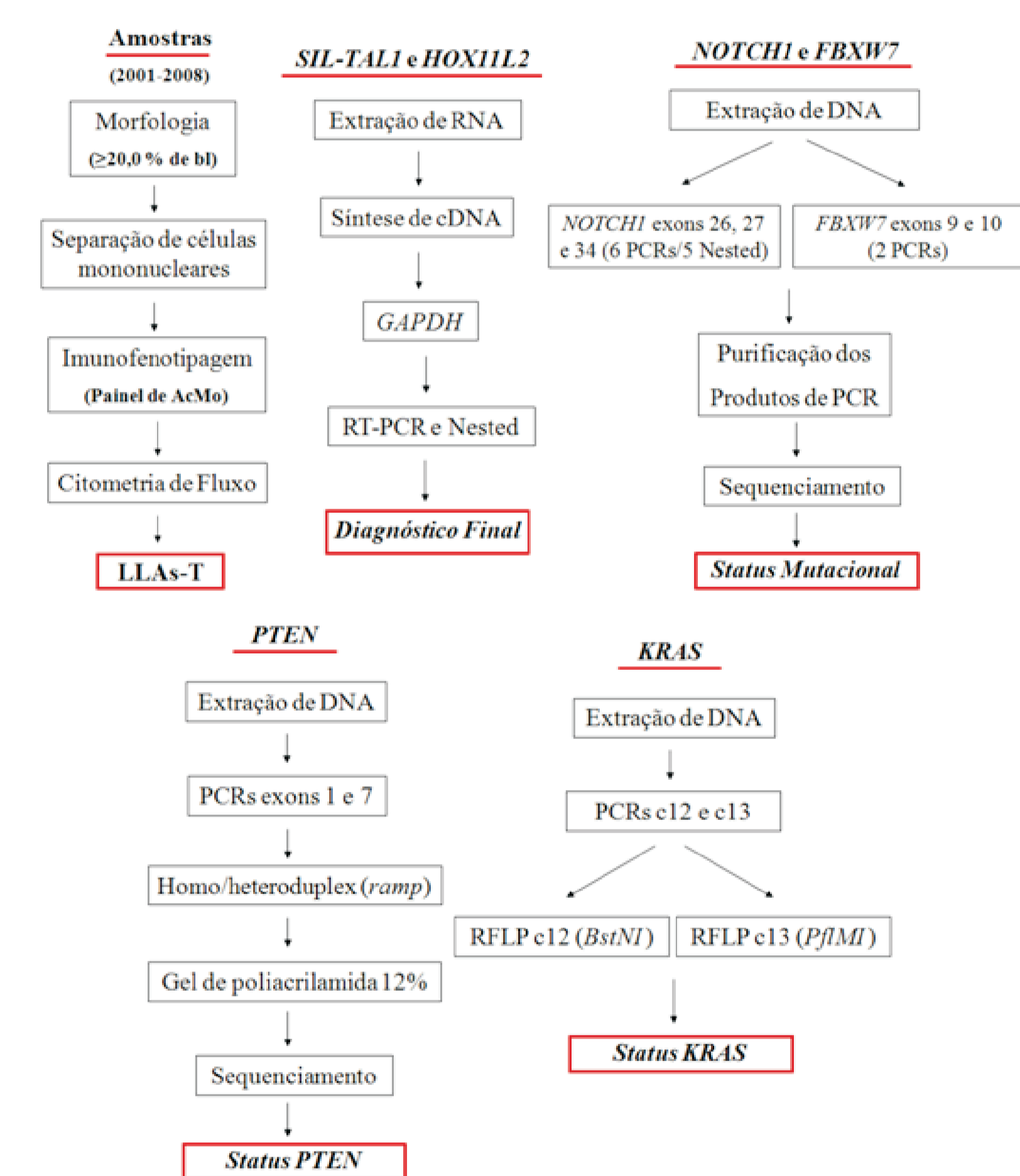
Principal

- Determinar o status do *NOTCH1* e testar se existe um perfil diferenciado de alterações capazes de influenciar no prognóstico das LLAs-T.

Secundários

- Analisar uma possível associação entre mutações de *NOTCH1* e o perfil clínico-demográfico de LLAs-T pediátricas;
- Verificar a co-existência de alterações genéticas características da LLA-T e o perfil mutacional do *NOTCH1*;
- Avaliar uma possível relação entre perfis de alterações genômicas e diferenciação de células-T de acordo com classificação imunofenotípica;
- Analisar o papel de *SIL-TAL1*, *HOX11L2*, *FBXW7*, *PTEN* e *KRAS* na sobrevida global dos pacientes com LLA-T
- Determinar se existe um perfil de anormalidades genéticas característico das LLAs-T de acordo com o status do *NOTCH1* em crianças com ≤ 24 meses de idade.

METODOLOGIA



- As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de *log-rank*. Verificamos através destas análises o impacto prognóstico das alterações moleculares estudadas na sobrevida dos pacientes com LLA-T do estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Características clínicas, demográficas e laboratoriais dos casos de LLA-T de acordo com o status do *NOTCH1*, 2001-2008

Variáveis	n (%)	NOTCH1 mut	NOTCH1 wt	p value*
Idade (Anos)				
< 10	71 (51,4)	28 (46,7)	43 (55,1)	0,324
10-18	67 (48,6)	32 (53,3)	35 (44,9)	
Sexo				
Masculino	100 (72,5)	46 (76,7)	54 (69,2)	0,332
Feminino	38 (27,5)	14 (23,3)	24 (30,8)	
WBC ($\times 10^9/L$)				
<50	63 (45,7)	29 (48,3)	34 (43,6)	0,579
≥ 50	75 (54,3)	31 (51,7)	44 (56,4)	
Massa Mediastínica*				
Sim	58 (44,6)	24 (42,9)	34 (45,9)	0,726
Não	72 (55,4)	32 (57,1)	40 (54,1)	
Cor da Pele				
Branca	60 (43,5)	21 (35,0)	39 (50,0)	0,078
Não-branca	78 (56,5)	39 (65,0)	39 (50,0)	
EGIL*				
T-I	18 (13,8)	9 (15,5)	9 (12,5)	0,343
T-II	29 (22,3)	9 (15,5)	20 (27,8)	
T-III	34 (26,2)	18 (31,0)	16 (22,2)	
T-IV	49 (37,7)	22 (37,9)	27 (37,5)	
CD10 status*				
Positivo	36 (31,0)	16 (30,2)	20 (31,7)	0,857
Negativo	80 (69,0)	37 (69,8)	43 (68,3)	
Estudos Moleculares				
<i>SIL-TAL1</i> P ⁺	37 (28,7)	19 (32,8)	18 (25,4)	0,355
<i>HOX11L2</i> P ⁺	10 (8,4)	6 (11,1)	4 (6,2)	0,332
<i>FBXW7</i> mut	21 (19,1)	13 (24,1)	8 (14,3)	0,192
<i>KRAS</i> mut	10 (9,5)	4 (7,7)	6 (11,3)	0,527
<i>PTEN</i> mut	9 (9,4)	5 (10,9)	4 (8,0)	0,650
Total	138 (100)	60 (100)	78 (100)	

Abbrev: n= números de casos; mut, mutado; WT, wild-type; WBC, white blood cells count ao diagnóstico; * 8 casos sem informação sobre presença de massa mediastínica, sendo 4 com mutação do *NOTCH1* e 4 wild-type; *classificação de acordo com os critérios EGIL, citometria de fluxo não foi realizada em 8 casos, 2 apresentando mutação do *NOTCH1* e 6 wild-type; *houve 22 casos sem o status do CD10 avaliado, 7 com mutação do *NOTCH1* e 15 wild-type; pos, positivo; neg, negativo.

Tabela 2 - Estágios maturativos-T versus status das alterações moleculares características das LLAs-T

	T-I n (%)	T-II n (%)	T-III n (%)	T-IV n (%)	p value*
<i>SIL-TAL1</i>					
Positivo	2 (14,3)	6 (21,4)	11 (32,4)	15 (31,9)	0,458
Negativo	12 (85,7)	22 (78,6)	23 (67,6)	32 (68,1)	
<i>HOX11L2</i>					
Positivo	2 (15,4)	1 (4,2)	3 (9,4)	4 (9,3)	0,717
Negativo	11 (84,6)	23 (95,8)	29 (90,6)	39 (90,7)	
<i>PTEN</i>					
Mutado	0 (0,0)	4 (21,1)	2 (8,7)	2 (5,9)	0,167
WT	13 (100)	15 (78,9)	21 (91,3)	32 (94,1)	
<i>KRAS</i>					
Mutado	2 (13,3)	3 (12,5)	3 (12,0)	2 (6,1)	0,803
WT	13 (86,7)	21 (87,5)	22 (88,0)	31 (93,9)	
<i>FBXW7</i>					
Mutado	1 (7,1)	7 (30,4)	11 (34,4)	2 (5,9)	0,008
WT	13 (92,9)	16 (69,6)	21 (65,6)	34 (94,4)	
<i>NOTCH1</i>					
Mutado	9 (50,0)	9 (31,0)	18 (52,9)	22 (44,9)	0,343
WT	9 (50,0)	20 (69,0)	16 (47,1)	27 (55,1)	
Total	18 (100)	29 (100)	34 (100)	49 (100)	

Análise estatística efetuada através do teste de qui-quadrado (χ^2).

Tabela 3 - Análises univariadas de sobrevida global (OS) e sobrevida livre de evento (EFS) em pacientes com T-ALL

Variáveis	OS* (95% CI)	p ^b	HR ^c (Min-Max)	EFS* (95% CI)	p ^b	HR ^c (Min-Max)
Idade (Anos)						
< 10	45,1 (48,9-74,5)	0,275	0,77 (0,48-1,24)	28,8 (30,8-57,8)	0,044	0,58 (0,34-1,00)
10-18	56,7 (60,7-88,0)			51,2 (51,9-85,8)		
WBC ($\times 10^9/L$)						
<50	47,6 (51,6-79,4)	0,606	0,88 (0,55-1,42)	41,3 (40,0-73,3)	0,659	1,05 (0,63-1,76)
≥ 50	53,3 (57,1-82,5)			36,7 (39,2-68,5)		
EGIL						
T-I	33,3 (28,8-77,2)	0,411	0,93 (0,74-1,18)	31,3 (26,9-75,9)	0,954	0,98 (0,77-1,24)
T-II	51,7 (48,2-88,7)			36,4 (31,5-75,5)		
T-III	61,8 (56,1-90,7)			45,0 (32,9-78,6)		
T-IV	51,0 (44,0-70,9)			36,7 (30,2-69,9)		
CD10						
Positivo	52,8 (50,6-86,9)	0,696	1,12 (0,63-1,97)	48,1 (42,6-83,6)	0,097	1,67 (0,80-3,08)
Negativo	50,0 (54,1-79,4)			28,8 (31,6-59,5)		
Cor da Pele						
Branca	55,0 (54,5-81,5)	0,451	1,20 (0,74-1,96)	33,3 (32,1-61,5)	0,551	0,78 (0,46-1,30)
Não-branca	47,4 (52,8-77,8)			43,4 (45,9-75,9)		
<i>NOTCH1</i>						
Mutado	53,3 (54,6-80,8)	0,479	1,19 (0,73-1,93)	34,2 (30,5-60,9)	0,382	0,79 (0,47-1,34)
WT	48,7 (57,7-82,2)			42,1 (45,5-74,2)		
Tipo de Mutação						
Pointal	42,4 (32,4-61,9)	0,031	0,43 (0,19-0,95)	30,4 (19,1-51,4)	0,289	0,65 (0,28-1,47)
Complexa	66,7 (65,6-100,9)			40,0 (31,4-79,4)		
<i>FBXW7</i>						
Mutado	61,9 (54,8-102,3)	0,512	1,28 (0,60-2,73)	58,3 (38,9-104,9)	0,586	1,29 (0,51-3,31)
WT	41,4 (47,2-74,7)			41,4 (47,2-74,7)		
<i>NOTCH1</i> - <i>FBXW7</i>						
Mutado	58,1 (62,5-89,6)	0,519	1,32 (0,76-2,28)	40,5 (37,6-72,3)	0,286	0,71 (0,37-1,34)
WT	47,9 (50,7-82,3)			48,5 (51,1-87,7)		
<i>SIL-TAL1</i>						
Positivo	37,8 (32,1-88,3)	0,012	0,53 (0,32-0,88)	18,2 (11,9-48,7)	0,004	0,46 (0,26-0,81)
Negativo	56,5 (60,9-81,9)			43,8 (46,4-71,1)		
<i>HOX11L2</i>						
Expresso	40,0 (13,4-44,6)	0,469	0,74 (0,32-1,71)	50,0 (14,3-50,2)	0,806	1,14 (0,41-3,16)
Ausente	48,6 (54,1-75,2)			35,6 (39,3-63,6)		
<i>KRAS</i>						
Mutado	60,0 (32,7-78,1)	0,585	1,32 (0,48-3,67)	57,1 (21,4-79,7)	0,584	1,38 (0,43-4,46)
WT	49,5 (55,7-77,9)			36,9 (41,5-66,9)		
<i>PTEN</i>						
Mutado	44,4 (15,1-56,1)	0,559	0,65 (0,26-1,66)	30,8 (34,6-66,1)	0,693	0,31 (0,53-1,51)
WT	57,5 (63,5-86,6)			42,0 (41,0-71,8)		
Resposta à Indução*						
Sim	68,4 (76,2-106,9)	<0,001	3,45 (1,74-6,85)	70,3 (75,5-107,7)	<0,001	3,54 (1,71-7,32)
Não	33,3 (25,9-55,9)			32,4 (23,4-48,6)		

- Em relação as característica clínico-demográficas da série de casos do estudo, somente a resposta terapêutica (resposta a indução) foi associada ao prognóstico das LLAs-T. Sobre o impacto prognóstico das características moleculares, as mutações complexas do *NOTCH1* foram significativamente associadas à melhor sobrevida dos pacientes ($p=0,031$), e a presença do *SIL-TAL1* teve impacto negativo significativo no prognóstico ($p=0,013$) (Figura 1)."

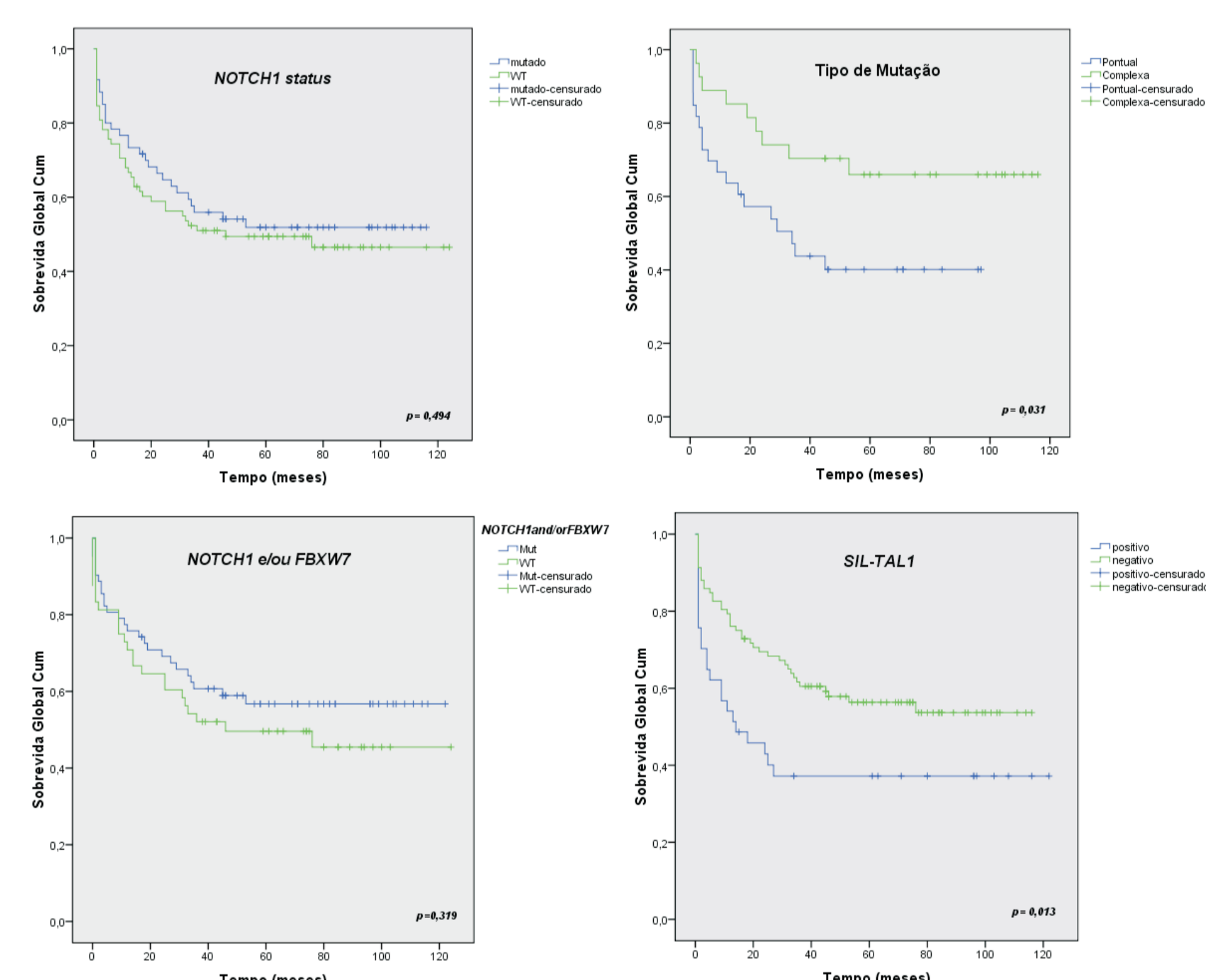


Figura 1 - Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevida global dos pacientes em função de diferentes marcadores moleculares. a) Status do *NOTCH1*; b) Tipo de Mutação do *NOTCH1*; c) Status *NOTCH1* e ou *FBXW7*; d) Presença do *SIL-TAL1*.

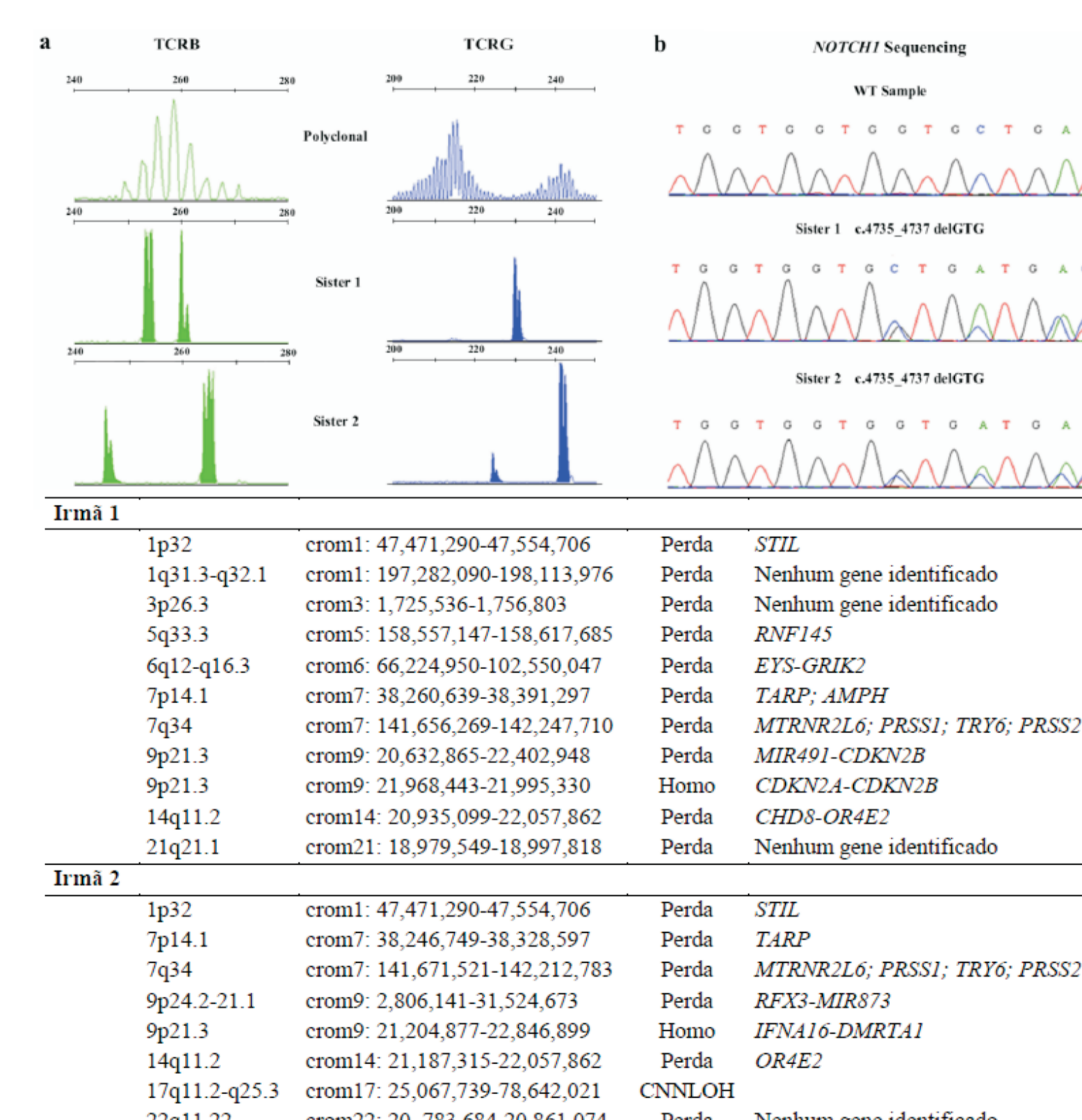


Figura 2 - Análises moleculares das irmãs. a) Análises dos rearranjos de TCR dos loci B e G através do Genemapper mostrando que as leucemias das irmãs foram monoclonais, mas cada irmã possuía rearranjos diferentes uma da outra; b) Eletroferogramas das sequências mutadas do gene *NOTCH1* de ambas as irmãs comparadas com uma sequência *NOTCH1* selvagem. Podemos observar na figura o ponto exato da c.4735_4737 delGTG, destacando-se a extrema semelhança entre as sequências de cada uma das irmãs; c) Alterações no número de cópias nas células das irmãs com LLA-T (localizações e identificações dos genes foram realizadas de acordo com UCSC Genome Browser na Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly).

CONCLUSÃO

- Em resumo, nossos resultados contribuíram para o melhor entendimento das LLAs-T, uma vez que identifica alterações genômicas que podem representar biomarcadores de relevância não só para o prognóstico, mas também para a etiopatogênese da doença.