

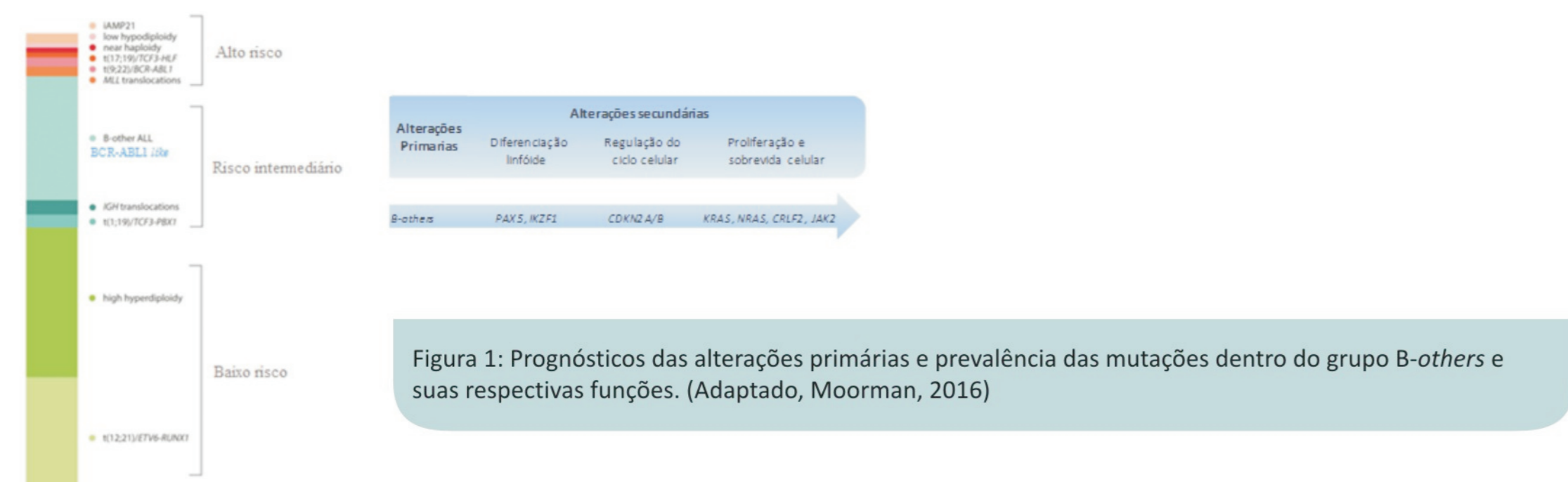
Citometria de fluxo multiparamétrica na predição da alta expressão celular e molecular de *CRLF2* na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Priscilla Moniz S. Ferreira¹, Elda Pereira Noronha¹, Camilla Andrade¹, Bruna K. S. de Souza¹, Bruno A. de Aguiar Gonçalves¹, Alessandra Faro¹, Caroline Barbieri Blunck¹, Carolina da Paz Zampier¹, Eugênia Terra-Granado¹, Maria S. Pombo-de-Oliveira¹

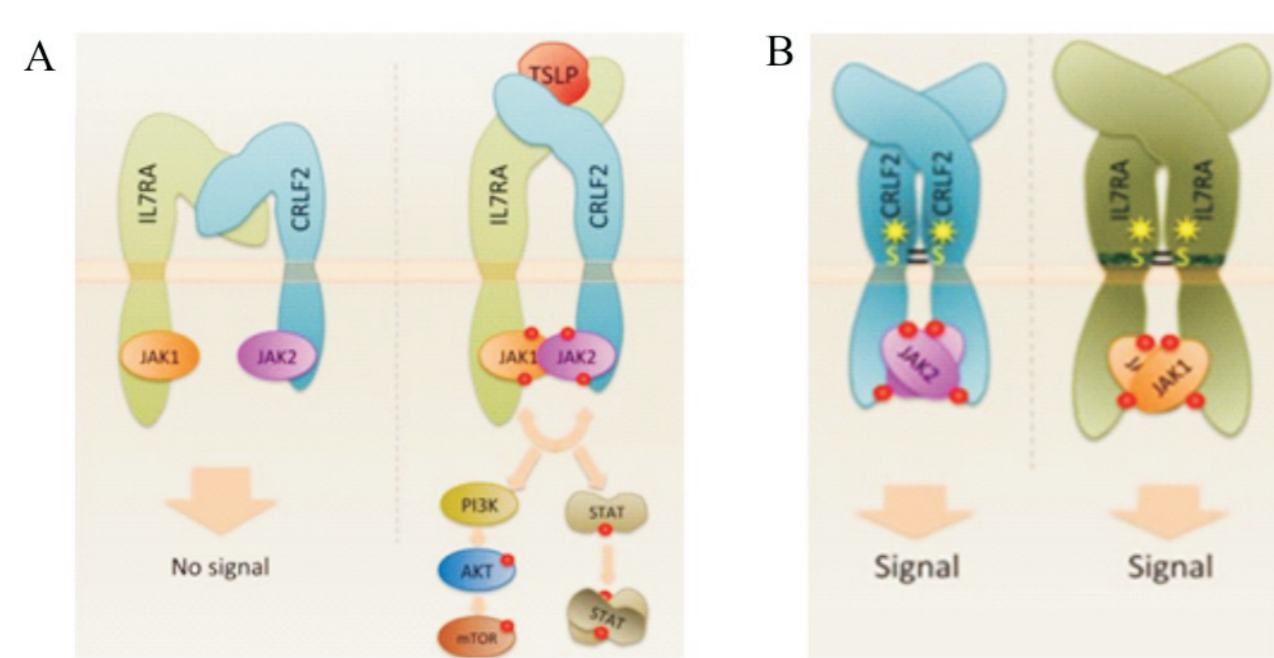
Instituto Nacional do Câncer – CPQ
Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos

INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-cpB) apresenta biomarcadores citogenético-moleculares clássicos, utilizados no diagnóstico para identificação e classificação em subgrupos com valor de prognóstico (Figura 1).



Aproximadamente 30% desses casos não possuem nenhuma dessas anormalidades e são referidas como B-others. Dentro deste subgrupo, cerca de 50% dos casos apresenta um perfil de expressão gênica semelhante com *BCR-ABL1*, chamado então de *BCR-ABL1-like*. Dentre esses casos há diferenças genéticas características, como as translocações envolvendo o *thymic stromal lymphopoietin receptor (CRLF2)*. Na presença do ligante *TSLP*, o *CRLF2* forma um heterodímero com a cadeia alfa do receptor de Interleucina 7 (*IL-7R α*) ou *CD127* que leva ativação da *JAK1* e *JAK2* e *STAT 5* (Figura 2). A alta expressão gênica do *CRLF2* ocorre em cerca de 17% dos casos e em mais de 50% de pacientes com síndrome de Down com LLA cpB.



Assim, o estabelecimento de um algoritmo de testes diagnósticos através da citometria de fluxo multiparamétrica poderia simplificar e otimizar a identificação da expressão aberrante do *CRLF2* e encaminhar o paciente para o tratamento através da estratificação de risco apropriado, já que estudo do *CRLF2* é um importante alvo terapêutico, particularmente no contexto de pacientes com síndrome de Down que são propensos aos efeitos secundários tóxicos da quimioterapia.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal:

- Estabelecer um algoritmo de testes combinados imunofenotípico e molecular capazes de prever o aumento de expressão do *CRLF2* em amostras de crianças com LLA-cpB.

2.2 Objetivos secundários:

- Testar um painel de anticorpos monoclonais por citometria de fluxo multiparamétrica e identificar LLA-cpB com a expressão diferencial do *CRLF2*;
- Correlacionar a expressão do gene *CRLF2* com seus níveis de expressão proteica e diferentes perfis imunofenotípicos de células precursoras B;
- Avaliar o nível de ploidia das amostras de LLA-cpB a fim de correlacionar a expressão do *CRLF2* e/ou as alterações genômicas presentes nesse subgrupo.

METODOLOGIA



RESULTADOS

Foram analisadas 99 amostras, destas, 18 amostras retrospectivas mantidas em solução de soro fetal bovino + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) foram descongeladas. A partir das amostras elegíveis para o estudo, foram adquiridos 300.000 eventos. Não foram separadas as células viáveis e posteriormente os leucócitos para a análise (Figura 3).

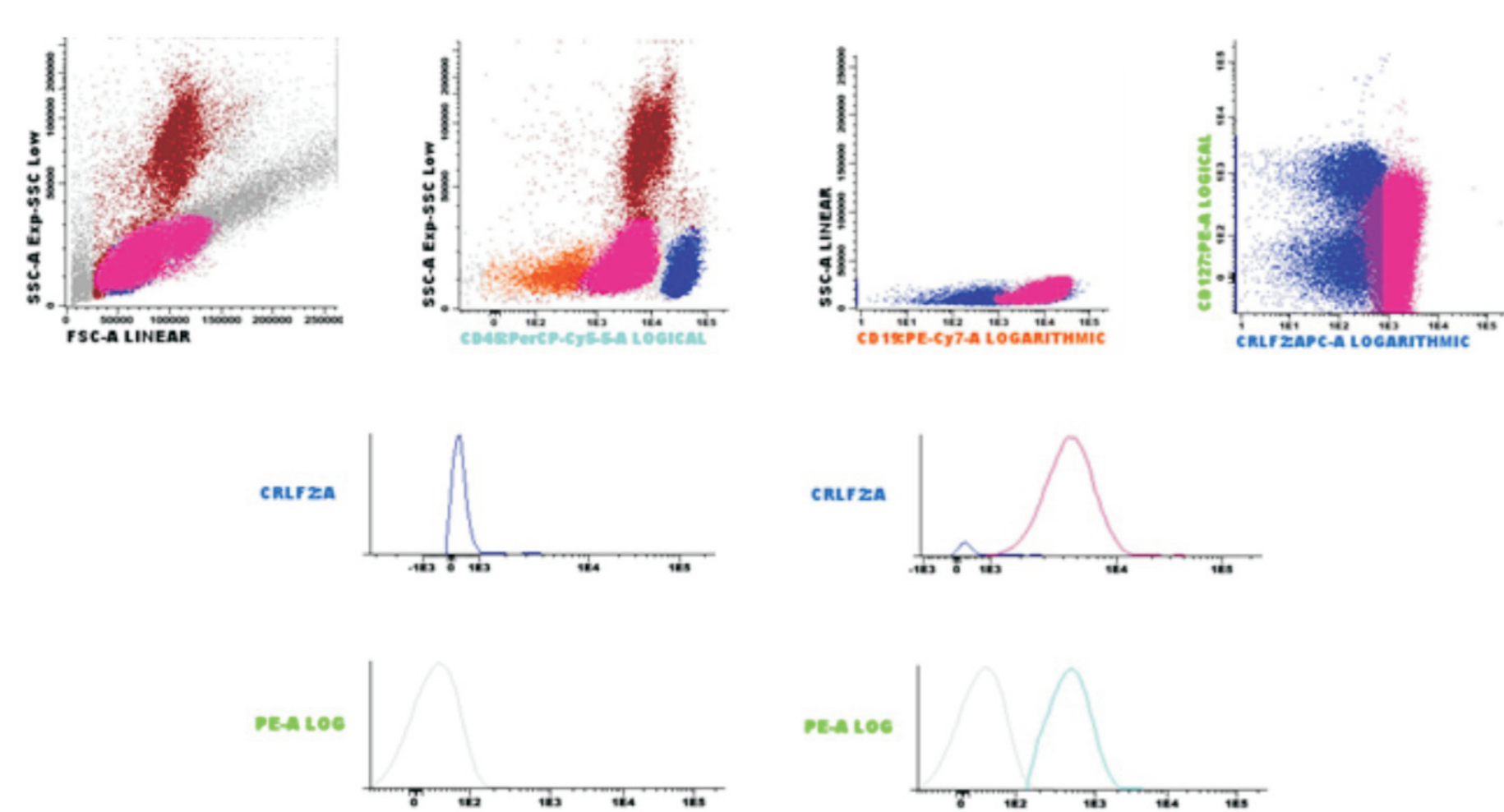


Figura 3: Análise da marcação do *CRLF2* e *CD127*. (A) Dotplots mostrando tamanho (FSC) x Granulosidade (SSC) das células. (B) Identificação dos blastos CD19 positivos. (C) Expressão do *CRLF2* e *CD127* nos blastos e linfócitos. (D) Histograma mostrando o perfil de expressão do *CRLF2* dos linfócitos (azul) e blastos (em rosa) e o perfil de expressão do *CD127* (PE) no tubo não marcado (cinza) e nos blastos (azul claro).

A identificação da expressão celular foi feita quanto ao percentual de marcação de *CRLF2* e *CD127* e a intensidade mediana de fluorescência (IMF) em blastos leucêmicos. A mediana de expressão quanto ao percentual de *CRLF2* foi 3,53% (0,07-99,7) de células positivas. A partir da distribuição de frequência em relação ao percentual de *CRLF2* foi possível separar quanto à expressão da molécula nos seguintes grupos: <20% (expressão baixa), $\geq 20\%$ e <70% (expressão intermediária) e $\geq 70\%$ (expressão alta) de células positivas (Figura 4A). Assim, de 99 casos analisados, 84 (84,8%) pacientes possuem baixa expressão, 6 (6,1%) expressão intermediária e 9 (9,1%) expressão alta de células positivas para *CRLF2*.

Foi verificada a distribuição de frequência utilizando o IMF do *CRLF2*, sendo a mediana de 1.013 (228-6.577) de células positivas, e a partir do percentil foram identificados os seguintes grupos: <1.013 (expressão baixa), ≥ 1.013 e <1.480 (expressão intermediária) e ≥ 1.480 (expressão alta) (Figura 4B).

Ao analisar a correlação entre IMF e % do *CRLF2* houve uma correlação positiva fraca ($r = 0,2371$) com p valor = 0,0187 (Figura 4C).

Foram observados 17/84 casos que possuem <20% de células positivas, com alta densidade de expressão (IMF > 1.480), estes pacientes serão melhor estudados quanto ao risco de recaída.

Na população estudada foram identificados 7 casos (7,9%) de LLA-pró B, 71 (79,8%) de B-comum e 11 (12,3%) de Pré-B. Foi observada uma diferença significativa ($p=0,0423$) em relação a porcentagem de células *CRLF2* positivas entre os casos de Pré-B (mediana 1,2%) e Pré-B (mediana 14,6%) (Figura 5A). Avaliando-se as alterações moleculares frequentes entre os casos de LLA-cpB foi observado que o grupo de alta expressão (> 70%) do *CRLF2* não possui alterações como *ETV6-RUNX1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1* e *MLL-r*. Comparando-se casos com presença e ausência dessas alterações foi observada diferença na expressão de *CRLF2* com significância estatística (p valor = 0,0253) (Figura 5B). Também foi verificado que os casos com a fusão *ETV6-RUNX1* apresentam uma expressão de *CRLF2* mais baixa (mediana 0,9%) do que os casos com *ETV6-RUNX1* negativo com mediana 3,6% ($p=0,0288$) (Figura 5B). É possível observar que os casos com *r-MLL* tiveram uma menor expressão quando comparados com casos sem o rearranjo, no entanto não houve valor estatístico. Apenas um caso foi positivo para *E2A-PBX1* e um caso para *BCR-ABL1*, não sendo possível fazer análise estatística. Foi feita análise também utilizando IMF do *CRLF2*, no entanto não houve nenhuma diferença com valor estatístico.

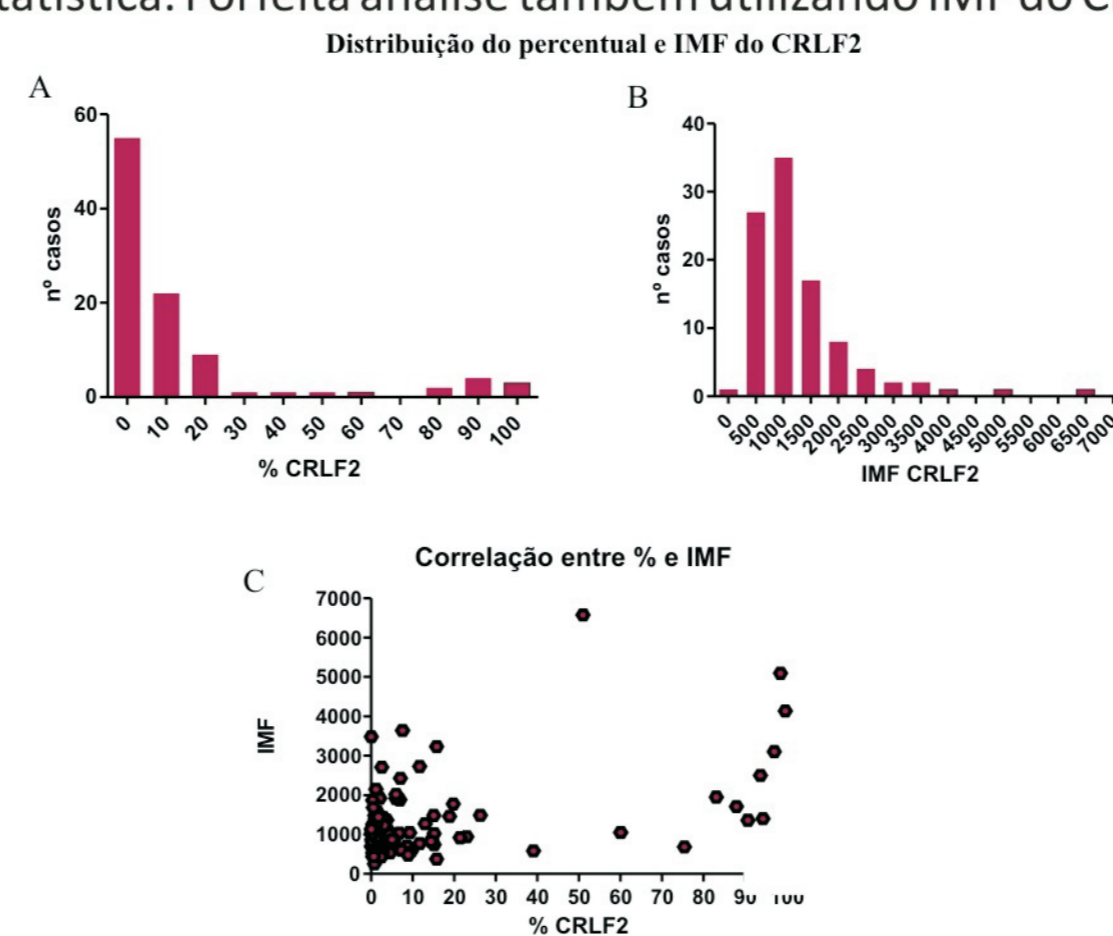


Figura 4: (A) Distribuição de frequência em relação ao percentual de células positivas para *CRLF2*. (B) Distribuição de frequência em relação à IMF de células positivas para *CRLF2*. (C) Correlação entre o percentual e o IMF.

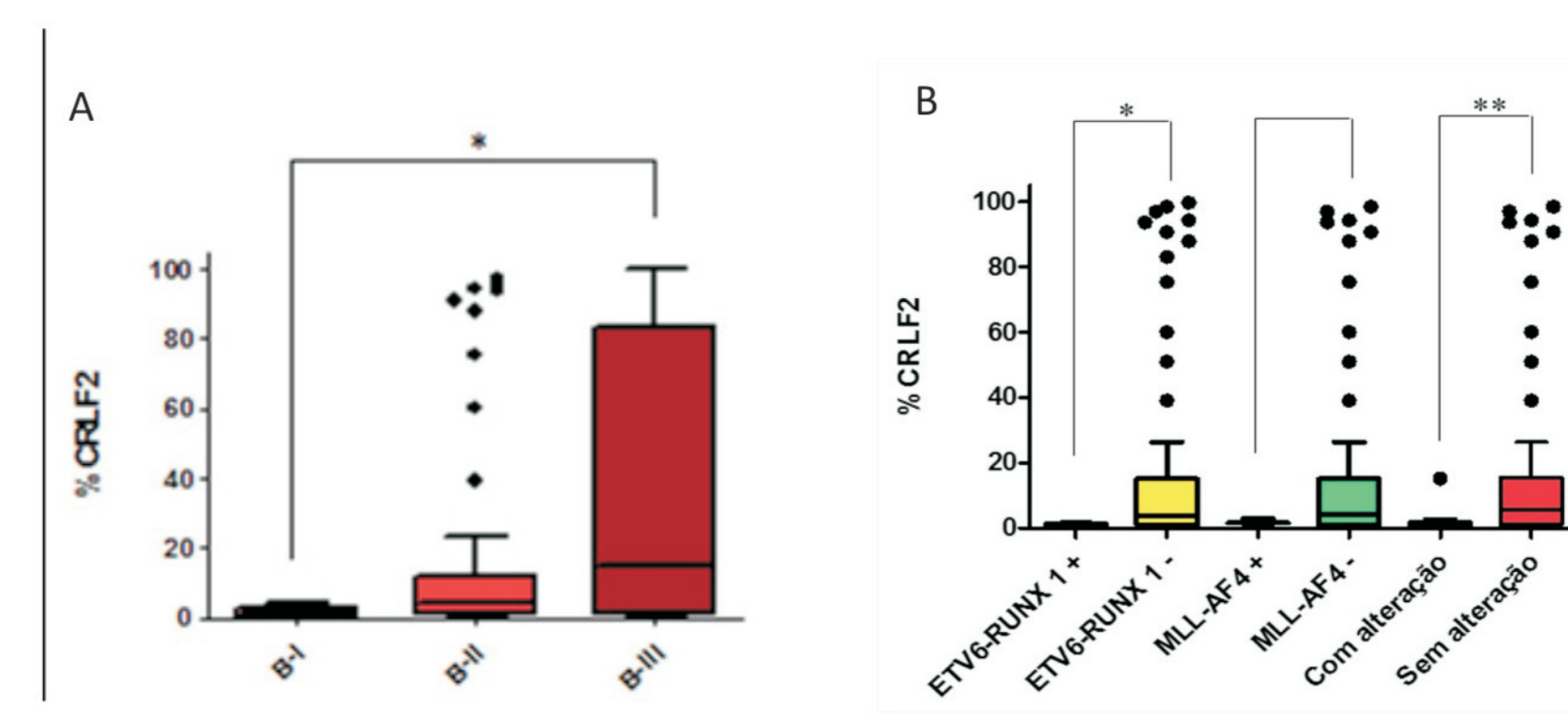


Figura 5: (A) Perfil de expressão de células positivas do *CRLF2* nos subtipos de LLA-cpB. (B) Comparação do perfil de expressão de células positivas do *CRLF2* em casos com e sem alterações moleculares.

Foram feitas as mesmas análises para o percentual e o IMF da molécula *CD127*. Foi analisada a expressão celular de 98 casos. A mediana de expressão quanto ao percentual foi 17% (0-99) de células positivas. A partir da distribuição de frequência foram definidos três grupos: <30% (expressão baixa), >30% e <64% (expressão intermediária) e >64% (expressão alta) (Figura 6A). Dessa forma 67 casos (68,4%) com expressão baixa, 22 (22,4%) com expressão intermediária e 9 (9,2%) com expressão alta. Foi analisada a IMF de células positivas, sendo a mediana 247 (130-5.700) e a partir do percentil foi separado nos seguintes grupos: <247 (expressão baixa), ≥ 247 e <323,7 (expressão intermediária) e $\geq 323,7$ (expressão alta) (Figura 6B). Ao analisar a correlação entre IMF e % do *CD127* houve uma correlação positiva fraca ($r=0,2773$) com p valor = 0,0057 (Figura 6C).

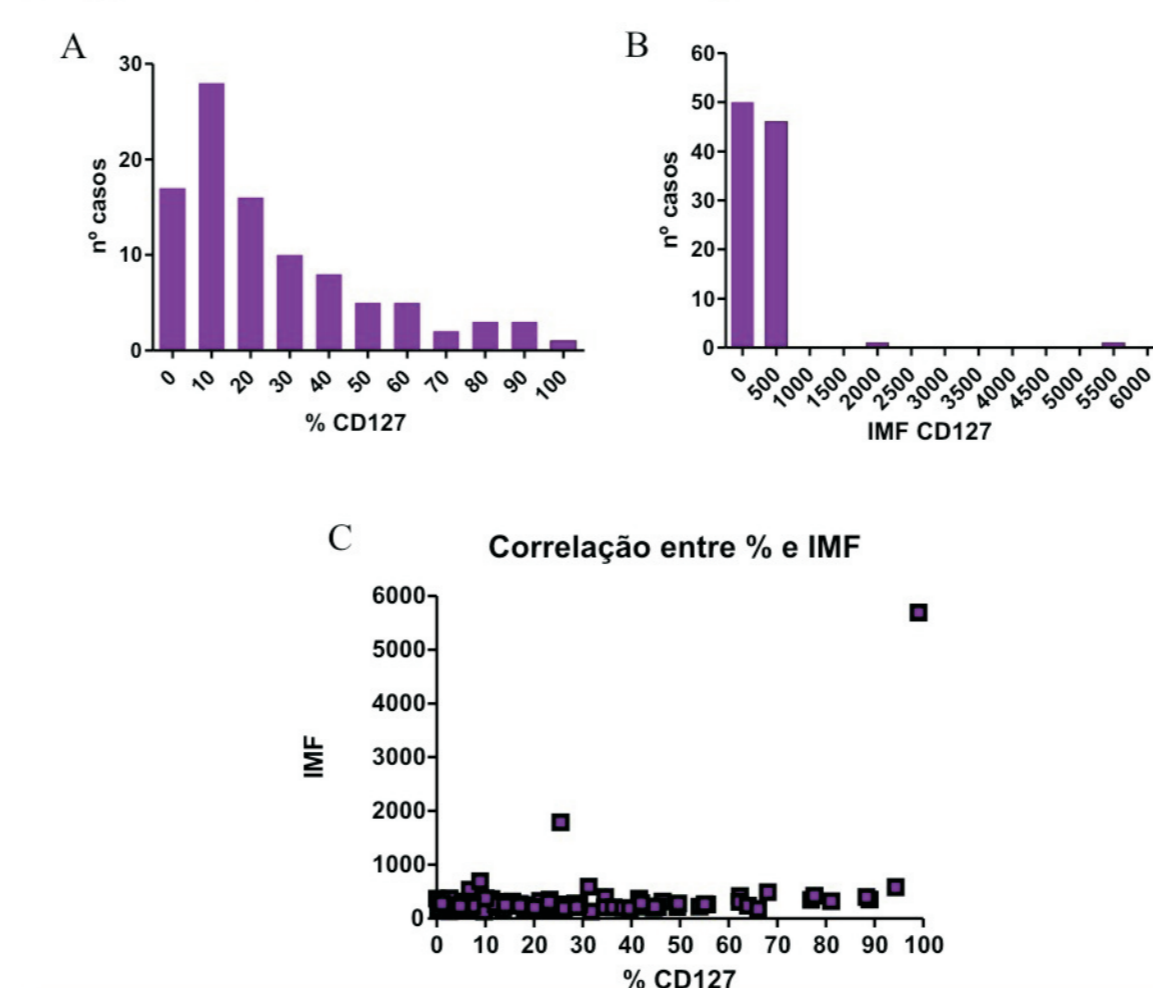


Figura 6: (A) Distribuição de frequência em relação ao percentual de células positivas para *CD127*. (B) Distribuição de frequência em relação ao IMF de células positivas para *CD127*. (C) Correlação entre o percentual e o IMF.

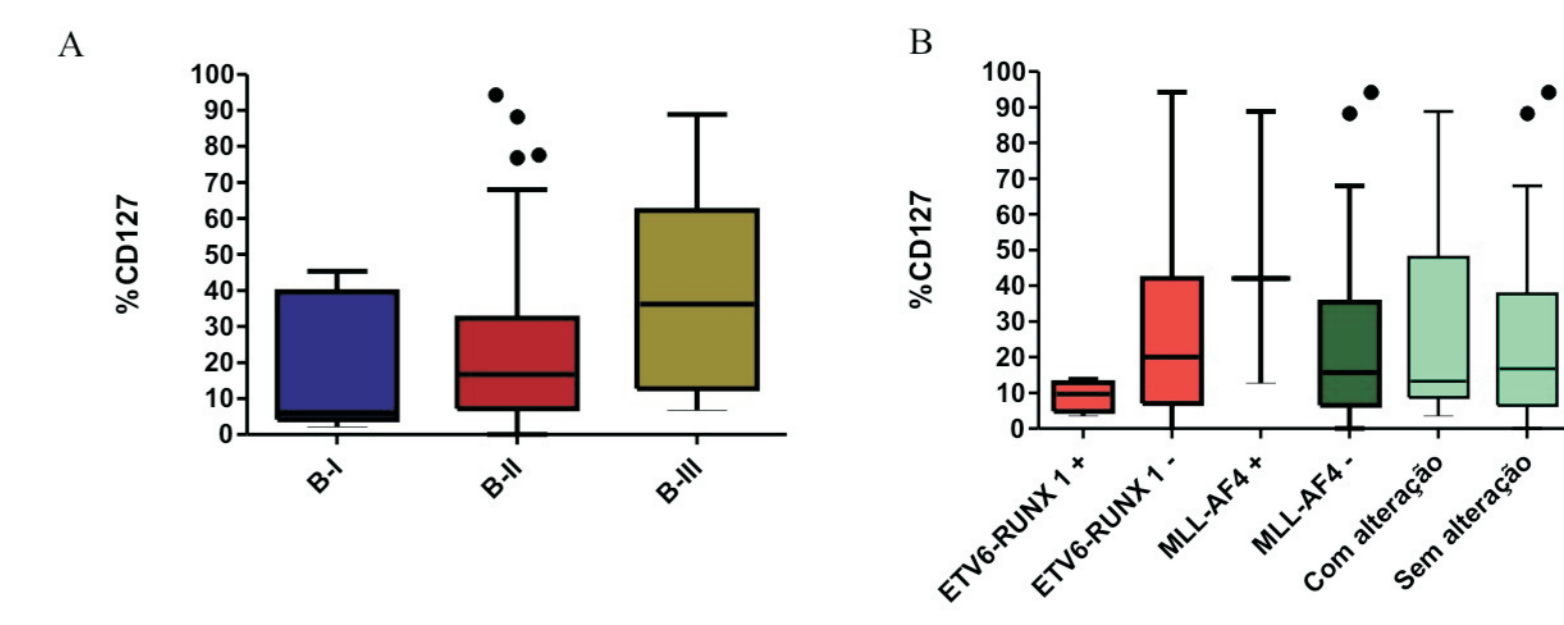


Figura 7: (A) Perfil de expressão de células positivas do *CD127* nos subtipos de LLA-cpB. (B) Comparação nos grupos com as principais alterações.

A análise foi feita utilizando o marcador *CD127* em relação ao percentual. Foram identificados os subtipos de LLA-cpB e não houve diferença significativa quanto ao percentual de células positivas (Figura 7A) mas é possível observar que a mediana aumenta de acordo com o perfil maturativo B-I, B-II e B-III, ou seja, nos casos Pré-B há um maior número de células positivas. As análises a partir das principais alterações moleculares de LLA-cpB não demonstraram diferença significativa (Figura 7B). Foi avaliado o IMF, no entanto não houve nenhuma diferença significativa.

As tabelas a seguir mostram as descrições clínico-demográficas das amostras avaliadas quanto à expressão de *CRLF2* (Tabela 1) e *CD127* (Tabela 2). Em relação a variável idade, houve um predomínio de pacientes <10 anos com a expressão do *CRLF2* baixa e intermediária (94,9%), em contrapartida pacientes com expressão alta (>70%) possuem em sua maioria idade > 10 anos ($p=0,0303$).

Na tabela 2 é visto a tabela clínico-demográfica utilizando a molécula *CD127* em relação ao percentual de células positivas. Os casos com alta leucometria (> 50.000) tem um maior predomínio de pacientes com alta expressão (p valor 0,0495). Nas outras variáveis não teve diferença estatística.

Tabela 1: Comparação das variáveis Clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular do *CRLF2*

Variáveis	n (%)	<20% n(%)	$\geq 20\%$ e <70% n(%)	$\geq 70\%$ n(%)	P valor
Nº de pacientes	99 (100)	84 (84,8)	6 (6,1)	9 (9,1)	
Idade (meses)					0,0303
<120	78 (78,8)	69 (82,1)	5 (83,3)	4 (44,4)	
>120	21 (21,2)	15 (17,9)	1 (16,7)	5 (55,6)	
Leucometria					0,4636
< 50.000	80 (80,8)	67 (79,8)	6 (100)	7 (77,8)	
≥ 50.000	19 (19,2)	17 (20,2)	0 (0)	2 (22,2)	
Sexo					0,8515
Masculino	55 (55,6)	46 (54,8)	4 (66,7)	5 (55,6)	
Feminino	44 (44,4)	38 (45,2)	2 (33,3)	4 (44,4)	
Cor da pele*					0,9233
Branca	45 (47,4)	39 (48,1)	2 (40)	4 (44,4)	
Não branca	50 (52,6)	42 (51,9)	3 (60)	5 (55,6)	

Tabela 1: (*)/99 não tiveram informações sobre cor da pele.

Tabela 2: Comparação das variáveis Clínico-demográficas de acordo com o perfil de expressão celular do *CD127*

Variáveis	n (%)	<30% n(%)	$\geq 30\%$ e <64% n(%)	$\geq 64\%$ n(%)	P valor
Nº de pacientes	98 (100)	67 (68,4)	22 (22,4)	9 (9,2)	
Idade (meses)					0,1178
<120	77 (78,6)	56 (83,6)	16 (72,7)	5 (55,6)	
>120	21 (21,4)	11 (16,4)	6 (27,3)	4 (44,4)	
Leucometria					0,0495
< 50.000	79 (80,6)	58 (86,6)	16 (72,7)	5 (55,6)	
≥ 50.000	19 (19,4)	9 (13,4)	6 (27,3)	4 (44,4)	
Sexo					0,7983
Masculino	55 (56,1)	37 (55,2)	12 (54,5)	6 (66,7)	
Feminino	43 (43,9)	30 (44,8)	10 (45,5)	3 (33,3)	
Cor da pele*					0,4939
Branca	45 (47,9)	29 (46)	10 (45,5)	6 (66,7)	
Não branca	49 (52,1)	34 (54)	12 (54,5)	3 (33,3)	

Tabela 2: (*)/99 não tiveram informações sobre cor da pele.

CONCLUSÕES PARCIAIS

- Não houve associação entre *CRLF2* e *CD127*;
- A maior expressão celular de *CRLF2* está relacionada à ausência das principais alterações moleculares estudadas nas LLA-cpB, no entanto, isso não é visto na expressão do *CD127*;
- Foi observada uma maior expressão celular de *CRLF2* no subtipo LLA Pré B, em relação ao subtipo LLA Pró-B. Já na expressão celular do *CD127* não foi visto diferença estatística;
- CFM pode ser uma ferramenta de grande importância para identificar os casos com alta expressão do *CRLF2* dentro da população de B-others tendo como alvo terapêutico a via tirosina quinase.

PERSPECTIVAS

É necessário ainda obter os resultados da expressão gênica do *CRLF2* afim de confirmar a expressão celular, além de analisar pacientes com síndrome de Down (4 casos) e recaídas (12 casos).